

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Zur Bedeutung des Mykotoxins Deoxynivalenol
im Wirt/Parasit-System Weizen/*Fusarium graminearum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Andreas Ludewig

aus Neumünster

Kiel, Dezember 2002

Dekan:	Prof. Dr. F. Taube
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. J.-A. Verreet
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-W. Dehne
Tag der mündlichen Prüfung:	13. Februar 2003

Gedruckt mit Genehmigung
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

„Groß sind die Werke des HERRN; wer sie erforscht, der hat Freude daran.“

(Psalm 111, Vers 2)

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	IX
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	8
2.1	Pflanzenmaterial	8
2.1.1	Saatgut, Substrat und Dünger	8
2.1.2	Oberflächensterilisation	8
2.1.2.1	Oberflächesterilisation zur Anzucht	8
2.1.2.2	Oberflächensterilisation für sterile Arbeitsmethoden	8
2.1.2.3	Oberflächensterilisation zur Reisolation bei der Wirtspassage	9
2.2	Pilzmaterial und Standard-Inkubation	9
2.3	Mykologische Methoden	11
2.3.1	Nährmedien und Substrate	11
2.3.2	Bestimmung der Sporendichte	11
2.3.3	Kryokonservierung	12
2.3.4	Herstellung von Einsporisolaten	12
2.3.5	Wirtspassage	13
2.4	Taxonomische Einordnung mittels PCR	14
2.4.1	Anzucht des Pilzmaterials	14
2.4.2	Isolierung von genomischer DNA	14
2.4.2.1	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Isolate 1-5, 37-54)	14
2.4.2.2	E.Z.N.A(Fungal DNA Mini Kit, peQLab) (Isolate 6-29, 34-36)	15
2.4.3	PCR (polymerase chain reaction)	15
2.4.3.1	Ansetzen des Reaktionsgemisches	15

2.4.3.2	Die PCR-Inkubation	16
2.4.4	Elektrophorese	16
2.4.4.1	DNA-Gele	17
2.4.4.2	PCR-Gele	17
2.4.5	Gel-Dokumentation	18
2.5	<i>In vitro</i>-Toxinbildung	18
2.5.1	Versuch zum Verlauf der Toxinbildung	18
2.5.1.1	Vorbereitung des Substrats	18
2.5.1.2	Vorbereitung des Inokulums	19
2.5.1.3	Inkubation und Probennahme	19
2.5.2	Screening-Test der Toxinbildung	19
2.5.2.1	Vorbereitung des Substrats	19
2.5.2.2	Vorbereitung des Inokulums	20
2.5.2.3	Inkubation und Versuchsende	20
2.6	Aggressivitätstest	20
2.6.1	Anzucht der Pflanzen	21
2.6.2	Vorbereitung des Inokulums	21
2.6.3	Inokulation und Inkubation bis zur Bonitur	22
2.6.4	Bonitur (7 dpi)	23
2.7	Inokulation von Ähren	23
2.7.1	Allgemeingültige Vorgehensweise der Inokulation der Ähren	24
2.7.1.1	Anzucht und Kulturmaßnahmen	24
2.7.1.2	Vorbereitung des Inokulums	25
2.7.1.3	Inokulation der Ähren	26
2.7.1.4	Bonitur und Probennahme	27

2.7.2	Spezielle Vorgehensweise der Einzel-Versuche der Ähren-Inokulation	30
2.7.2.1	Erster Versuch	30
2.7.2.2	Zweiter Versuch	30
2.7.2.3	Dritter Versuch	30
2.7.2.4	Vierter Versuch	32
2.8	Aufarbeitung des Probenmaterials für die Mykotoxin-Analysen	33
2.8.1	Probenvorbereitung	33
2.8.2	Extraktion	34
2.8.2.1	Ähren-Proben	35
2.8.2.2	Reis-Proben	35
2.8.3	Aufreinigung der Extrakte der Ähren- und Reis-Proben	36
2.8.4	Einengen am Rotationsverdampfer	36
2.8.5	Wiederaufnehmen der Probe und Lagerung	37
2.9	Analytik der Mykotoxine	37
2.9.1	Die Komponenten der Messanlage	38
2.9.2	Aufbau der HPLC-Anlage	39
2.9.3	Parameter der zu analysierenden Mykotoxine	40
2.9.4	Verwendete HPLC-Methoden	41
2.9.4.1	Methode für die Ähren-Matrix (M1)	42
2.9.4.2	Methode für die Reis-Matrix (M2)	42
2.9.5	Herstellung und Chromatogramme der Standards	44
2.9.6	Integration der Rohdaten	48
2.9.7	Auswertung der Chromatogramme	49
2.9.7.1	Qualitative Auswertung der Chromatogramme	49
2.9.7.2	Quantitative Auswertung der Chromatogramme	52

2.9.7.2.1	Auswertung nach den Schreiberprotokollen	52
2.9.7.2.2	Auswertung mit Hilfe der Software LCtalk	53
2.9.7.2.3	Berechnung der Toxinkonzentration in den Proben unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren	54
2.9.7.2.4	Berechnung weiterer Größen (DON 2, DON 3)	55
2.10	Statistische Auswertung	56
3.	Ergebnisse	57
3.1	Methodische Ergebnisse	57
3.1.1	Ergebnisse zur Probenbearbeitung für die Mykotoxinanalysen	57
3.1.1.1	Anzahl der Extraktionsschritte	57
3.1.1.2	Anzahl der Elutionsschritte	57
3.1.1.3	Reproduzierbarkeit der Elution	58
3.1.1.4	Reproduzierbarkeit der Bearbeitungsschritte nach der Elution	59
3.1.1.5	Lagerung der Proben	60
3.1.2	Ergebnisse zur Analytik der Mykotoxine (HPLC)	62
3.1.2.1	Kalibrierkurven	62
3.1.2.2	Nachweisgrenze	64
3.1.2.3	Wiederfindungsrate	65
3.1.2.3.1	Reis-Matrix	66
3.1.2.3.2	Ähren-Matrix	68
3.1.2.4	Reproduzierbarkeit der HPLC	70
3.2	Taxonomische Einordnung mittels PCR	71
3.2.1	Ergebnisse zur Isolierung genomischer DNA	71
3.2.2	Ergebnisse zur PCR mit pathogenspezifischen Primern	72
3.3	Ergebnisse zur Toxinproduktion <i>in vitro</i>	78
3.3.1	Ergebnisse zum Verlauf der Trichothecenbildung	78

3.3.2	Ergebnisse zum Screening-Test der Toxinbildung	81
3.3.2.1	Bildung von DON	81
3.3.2.2	Bildung von ADON	83
3.3.2.3	Bildung von NIV	83
3.3.2.4	Bildung von ANIV	85
3.3.2.5	Bildung von ZON	85
3.3.2.6	Zusammenfassende Darstellung aller untersuchten Toxine	88
3.3.2.7	Korrelation zwischen DON und ADON	90
3.3.3	Chromatogramme zur Toxinbildung <i>in vitro</i>	91
3.4	Ergebnisse des Aggressivitätstests	93
3.4.1	Einfluss der Sporendichte	93
3.4.2	Symptomausprägung nach sieben Tagen	95
3.4.2.1	Verbräunungslänge	96
3.4.2.2	Stängelumfassung der Verbräunung	98
3.4.2.3	Befallshäufigkeit	100
3.4.2.4	Zusammenfassende Betrachtung der Schädigung nach sieben Tagen	102
3.4.2.5	Korrelation zwischen den Befallsparametern	102
3.5	Korrelation zwischen Toxinbildung und Aggressivität	104
3.6	Vergleich der vier <i>Fusarium graminearum</i>-Isolate vor und nach der Wirtspassage	107
3.6.1	Einfluss einer Wirtspassage auf die Mykotoxinproduktion	107
3.6.2	Einfluss einer Wirtspassage auf die Aggressivität	109
3.7	Ergebnisse zu den Ähren-Inokulationen	112
3.7.1	Vorversuch zur Sporendichte im Inokulum	112
3.7.2	Erste Ähren-Inokulation (Isolate 34 und 37)	113

3.7.2.1	Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts	113
3.7.2.2	Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern auf Ebene der Einzelähren	116
3.7.3	Zweite Ähren-Inokulation (Isolate 35 und 36)	120
3.7.3.1	Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts	120
3.7.3.2	Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern auf Ebene der Einzelähren	125
3.7.4	Zusammenfassende Betrachtung der ersten und zweiten Ähren-Inokulation und Korrelation zwischen DON-Gehalt und Befall auf Isolat-Ebene	130
3.7.5	Dritte Ähren-Inokulation (Isolate 34 - 37)	133
3.7.5.1	Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts	133
3.7.5.2	Korrelationen zwischen DON- Gehalt und Befallsparametern auf Ebene der Einzelähren	140
3.7.5.3	Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befall auf Isolat-Ebene	145
3.7.6	Vergleich von Ähren-Inokulation 1 und 2 mit Ähren-Inokulation 3	150
3.7.7	Auswertung der Proben 63 dpi der 3. Ähren-Inokulation	152
3.7.7.1	Ertrag und Befall	152
3.7.7.2	Korrelationen von Ertrag und Befall auf Ebene der 45 Einzelähren	158
3.7.7.3	Ergebnisse zum DON-Gehalt	160
3.7.7.4	Korrelationen zwischen DON-Gehalt, Befall und Ertrag auf Ebene der 12 Mischproben	162
3.7.7.5	Korrelationen zwischen DON-Gehalt, Befall und Ertrag auf Isolat-Ebene	165
3.7.7.6	Zusammenfassung zu den Ernte-Ergebnissen der 3. Ähren-Inokulation	166

3.7.8	Vierte Ähren-Inokulation	167
3.7.8.1	Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts	167
3.7.8.2	Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern auf Ebene der Einzelähren	170
3.7.9	Chromatogramme zur Ähren-Inokulation	174
4.	Diskussion	176
4.1	Probenaufarbeitung und Analytik der Mykotoxine	176
4.1.1	Probenaufarbeitung	176
4.1.2	Wiederfindungsraten	179
4.1.3	Analytik	183
4.1.4	Zearalenon (ZON)	187
4.1.5	Zusammenfassung	189
4.2	Taxonomische Einordnung mittels PCR	189
4.3	Toxinproduktion in vitro	192
4.3.1	Verlauf der Trichothecenbildung	192
4.3.2	Screening-Test der Toxinproduktion und Trichothecen-Chemotypen	194
4.4	Aggressivitätstest und Korrelation zur Toxinproduktion in vitro	197
4.5	Einfluss einer Wirtspassage auf Toxinproduktion und Aggressivität	201
4.6	Ähren-Inokulationen	203
4.6.1	Verlauf des Befalls und des DON-Gehalts	203
4.6.2	Korrelationen zwischen DON-Gehalt und anderen Parametern	208
4.6.3	Vergleich der Sorten Picolo und Frontana	217
4.7	Ausblick	223
5.	Zusammenfassung	224

6.	Summary	227
7.	Literatur	230
8.	Anhang	249
A.1	Chemikalien	249
A.2	Puffer und Lösungen	249
A.3	Nährmedien, Substrate, Dünger und Wachstumsregler	250
A.4	Verbrauchsmaterialien	251
A.5	Geräte	251
A.6	Ergänzende Angaben zu <i>Fusarium</i> -Isolaten und Weizen-Sorten	253
A.7	Ergänzende Angaben zur taxonomischen Einordnung mittels PCR	255
A.8	Ergänzende Angaben zur Untersuchung der Toxinproduktion <i>in vitro</i> auf Reis	257
A.9	Ergänzende Angaben zum Aggressivitätstest	258
A.10	Ergänzende Angaben zu den Ähren-Inokulationen	261
A.11	Ergänzende Angaben zur Analytik der Mykotoxine (HPLC)	267

Abkürzungsverzeichnis

%K	Anteil ausgebildeter Körner an der Gesamtzahl der Körner
<1,8	Korngrößenklasse ”< 1,8 mm” Durchmesser
>2,8	Korngrößenklasse ”> 2,8 mm” Durchmesser
15ADON	15-Acetyl-Deoxynivalenol
3ADON	3-Acetyl-Deoxynivalenol
ADON	Acetyl-Deoxynivalenol
ANIV	4-Acetyl-Nivalenol (Fusarenon X)
BH	Befallshäufigkeit der Ährchen (%)
bp	Basenpaare
DAD	diode array detector
DC	Dünnschichtchromatographie
dest. Wasser	destilliertes Wasser (VE-Wasser)
DON	Deoxynivalenol (obwohl die deutsche Bezeichnung Desoxynivalenol lautet, wird die gebräuchlichere englische Form verwendet), Vomitoxin
DON 1	DON-Menge in µg/g TM (ppm)
DON 2	DON-Menge in µg/g befallene TM (ppm)

DON 3	DON-Menge ($\mu\text{g}/\text{Ähre}$)
dpi	dies post infectionem (Tage nach der Infektion)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FM	Frischmasse
FUBK	Fläche unter der Befallskurve
GC	Gaschromatographie
gK	Anteil gesunder Körner (\triangleq unbef)
HPLC	high performance liquid chromatography
KÄ	Kornzahl pro Ähre
KmÄ	Kornmasse pro Ähre
lbK	Anteil leicht befallener Körner (\triangleq lei-bef)
lei-bef	Anteil leicht befallener Körner (\triangleq lbK)
LSD	Grenzdifferenz (least significant difference)
MS	Massenspektrometrie
NIV	Nivalenol
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)

PDA	potato dextrose agar
PDB	potato dextrose broth
ppm	parts per million ($\hat{=}$ mg/kg oder mg/l)
SNA	spezieller nährstoffarmer Agar
SN-Boullion	spezielle nährstoffarme Boullion
st-bef	Anteil stark befallener Körner ($\hat{=}$ stbK)
stbK	Anteil stark befallener Körner ($\hat{=}$ st-bef)
SW	Sommerweizen
TKM	Tausendkornmasse
TM	Trockenmasse
unbef	Anteil gesunder Körner ($\hat{=}$ gK)
WA6C oder WA8C	Wasser-Agar (0,6 % oder 0,8 %) mit 0,1 mM CaSO ₄
WDH	Wiederholung
WG	Wassergehalt
WW	Winterweizen
ZON	Zearalenon

1. Einleitung

Fusarium graminearum als Pathogen

Fusarium graminearum (Schwabe) (Deuteromycotina, Hyphomycetes, Tuberculariales, *Fusarium*, Sektion *Discolor*) ist ein weltweit verbreiteter Erreger von Keimlings-, Halmbasis- und Ährenkrankheiten der Poaceen, der wärmere, kontinental beeinflusste Regionen bevorzugt (PARRY *et al.* 1995). Insbesondere an Weizen und Mais führt eine Erkrankung unter günstigen Witterungsbedingungen zu hohen Ertrags- und Qualitätseinbußen und zu einer erheblichen Belastung des Erntegutes mit Mykotoxinen (BARTELS 1998, SCHAAFSMA *et al.* 2001).

Als fakultativer Parasit kann *F. graminearum* auf Ernterückständen auf dem Feld überdauern (SUTTON 1982), wo schon im Herbst die Perfektform *Gibberella zeae* ([Schw.] Petch) (Ascomycotina, Pyrenomycetes, Hypocreales) erscheint und Perithezien gebildet werden (GILBERT UND TEKAUZ 2000). Von diesem Inokulum ausgehend werden Jungpflanzen, aber später auch die Halmbasis und die Ähren infiziert (TEICH 1989). Hierbei bilden die Ascosporen das Primärinokulum (GILBERT UND TEKAUZ 2000). Die Ausbreitung im Bestand erfolgt auch über Konidiosporen (PRITSCH *et al.* 2000, PARRY *et al.* 1995). Die größte Anfälligkeit für eine Ähreninfektion liegt beim Weizen zur Blüte vor, aber gelegentlich treten auch Infektionen während des Ährenschiebens oder erst nach der Blüte auf (LACEY *et al.* 1999, SUTY UND MAULER-MACHNIK 1998). Die jeweilige Befallssituation wird neben der Witterung von der Fruchtfolge, der Bodenbearbeitung und der Sortenwahl beeinflusst (PARRY *et al.* 1995, YI *et al.* 2001).

Genetische Ressourcen für die Resistenzzüchtung gegen Ährenfusariosen liegen vor allem in Sommerweizen-Sorten asiatischen oder südamerikanischen Ursprungs (SNIJDERS 1990, MESTERHAZY 2000). Die chemische Bekämpfung gestaltet sich gegen den Erregerkomplex der Ährenfusariosen als schwierig, denn neben *F. graminearum* können noch mindestens 16 weitere *Fusarium*-Arten beteiligt sein (NIRENBERG 1981, MIEDANER 1997). Erste Erfolge durch den Einsatz von azol- oder strobilurinhaltigen Fungiziden sind zu verzeichnen (MESTERHAZY UND BARTOK 1997, SUTY UND MAULER-MACHNIK 1996, MATTHIES *et al.* 2000), wobei in einer Studie von PIRGOZLIEV *et al.* (2002) ein strobilurinhaltiges Fungizid verglichen mit einem Azol-Fungizid weniger effektiv war. Kritisch beachtet werden muß, daß der Parameter Deoxynivalenol-Gehalt (DON) auch bei einer Reduktion des *Fusarium*-Befalls nicht notwendigerweise ebenfalls reduziert wird (GAREIS UND CEYNOWA 1994). Von MAGAN *et al.* (2002) wurde sogar von einer Förderung der DON-Bildung durch *F. culmorum in vitro*

durch ein strobilurinhaltiges Fungizid berichtet. Weder durch züchterische noch chemische Maßnahmen konnte bisher ein befriedigender Erfolg gegen die Ährenfusariosen erzielt werden.

***Fusarium graminearum* als Mykotoxinbildner**

Bei *F. graminearum* stellen die Trichothecene vom B-Typ (Abb.1.1a) neben Zearalenon (ZON) (Abb.1.1c) die wichtigste Mykotoxingruppe dar.

Bei ZON handelt es sich um ein Polyketid mit östrogenen Wirkung (STOB *et al.* 1962; OLSEN 1989), das über den Acetat-Malonat-Weg synthetisiert wird.

Die Trichothecene (Abb.1.1d) sind Sesquiterpene (Acetat-Mevalonat-Weg) mit einer Epoxy-Gruppe an C12, C13. Ausgehend von Acetyl-CoA wird über die Metaboliten Mevalonat und Isopentenylpyrophosphat („aktives Isopren“) der C15-Körper Farnesylpyrophosphat synthetisiert. Durch die Trichodiensynthase wird Farnesylpyrophosphat zu Trichodien umgewandelt, einer Vorstufe der Trichothecene (BROWN *et al.* 2001). Ohne diese Enzyme unterbleibt die Trichothecenbildung (PROCTOR *et al.* 2002). Die Trichothecene lassen sich nach der jeweiligen Substitution in vier Gruppen einteilen (UENO 1977), wobei für die von *F. graminearum* gebildeten Trichothecene vom B-Typ die Carbonylfunktion am C8-Atom kennzeichnend ist (Abb. 1.1a).

Den Trichothecen vom A-Typ fehlt diese Keto-Gruppierung am C8-Atom. T2-Toxin beispielsweise ist am C8-Atom stattdessen mit einem 3-Methyl-butyryl-Rest verestert. Die Trichothecene vom A-Typ werden von Arten wie *F. sporotrichioides* oder *F. acuminatum* gebildet und gelten als deutlich cytotoxischer als B-Typ-Trichothecene (BOTTALICO UND PERRONE 2002, GUTLEB *et al.* 2002).

Ein bekannter Wirkmechanismus der Trichothecene ist die Hemmung der eukaryotischen Ribosomen (Peptidyltransferase auf der 60 S-Untereinheit) und somit der gesamten Proteinbiosynthese (CUNDLIFFE *et al.* 1974, FEINBERG UND MCCLAUGHLIN 1989). Die Trichothecene sind dermatotoxisch, zytotoxisch (RAHMAN *et al.* 1993), genotoxisch, immunsuppressiv (SHARMA 1993), teratogen und teilweise kanzerogen (UENO 1977). Daher stellen sie, wenn sie bei Ährenbefall im geernteten Getreide auftreten, ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar (MIROCHA 1983). Die Trichothecene sind ebenfalls phytotoxisch (WAKULINSKI 1989, PACKA 1991, WISNIEWSKA UND CHELKOWSKI 1994, McLEAN 1996b, MILLER UND EWEN 1997).

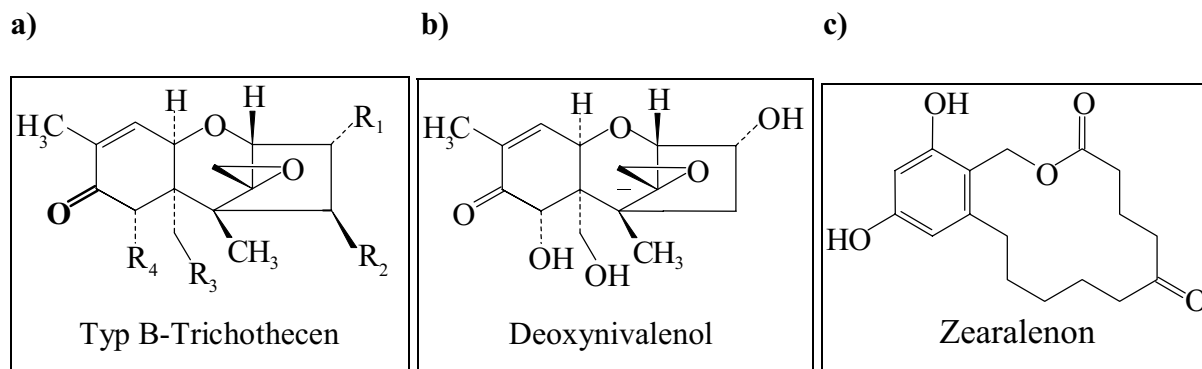
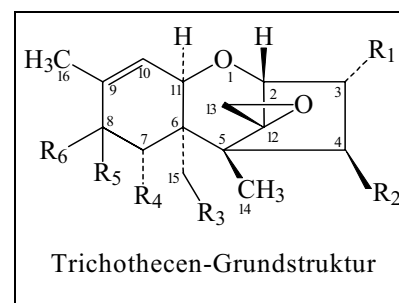


Abbildung 1.1: Strukturformeln einiger Mykotoxine. a) Grundstruktur der Typ-B-Trichothecene; b) Deoxynivalenol; c) Zearalenon; d) Trichothecen-Grundstruktur.

Tabelle 1.1: Substituenten der wichtigsten von *F. graminearum* gebildeten Typ-B-Trichothecene

	R1	R2	R3	R4
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH
3-Acetyl-Deoxynivalenol	Acetyl	H	OH	OH
15-Acetyl-Deoxynivalenol	OH	H	Acetyl	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
4-Acetyl-Nivalenol	OH	Acetyl	OH	OH

d)



Von *F. graminearum* wird vor allem Deoxynivalenol (DON, "Vomitoxin", Abb. 1.1b) mit seinen Acetyl-Derivaten 3-Acetyl-DON (3ADON) und 15-Acetyl-DON (15ADON), aber auch Nivalenol (NIV) und 4-Acetyl-Nivalenol (ANIV, "Fusarenon X") gebildet (BOTTALICO *et al.* 1989, LOGRIECO *et al.* 1990, Tab. 1.1). Hierbei gehören Trichothecen bildende Isolate in aller Regel entweder dem DON- oder dem NIV-Chemotyp an (ICHINOE UND KURATA 1983, MILLER *et al.* 1991, LAUREN *et al.* 1992).

Thema der Arbeit und Fragestellungen

Die von phytopathogenen Pilzen gebildeten Toxine lassen sich in wirtsspezifische und nicht wirtsspezifische Toxine (RUDOLPH 1976) einteilen. Erstere sind der weitaus seltenere Fall (etwa ein Dutzend davon sind bekannt). Ein solches Toxin ist stets zur Errichtung einer kompatiblen Wirt/Parasit-Interaktion notwendig und kann auch als primäre Determinante be-

zeichnet werden. Ein nicht wirtsspezifisches Toxin hingegen ist niemals eine primäre Determinante, kann aber als Virulenzfaktor (sekundäre Determinante) die Intensität der Wirt/Parasit-Interaktion beeinflussen (YODER 1980, MITCHELL 1984).

In dieser Arbeit werden die Begriffe Virulenz oder Virulenzfaktor vermieden, da eine fälschliche Assoziation mit der Gen-für-Gen-Hypothese (Virulenz[gen], Avirulenz[gen]) und dem Vorhandensein einer wirtsspezifischen Beziehung gegeben sein könnte. Um einer Verwechslung vorzubeugen, werden stattdessen die Begriffe Aggressivität und Aggressivitätsfaktor verwendet, um das quantitative Schädigungspotential eines *Fusarium*-Isolats oder Toxins zu beschreiben. Als Mykotoxin gilt ein für Vertebraten toxisches nicht-wirtsspezifisches, von Schimmelpilzen gebildetes Toxin (RUDOLPH 1976). Als Mykotoxin im weiteren Sinne gilt jedoch jeder Sekundärmetabolit eines Schimmelpilzes, der für Säugetiere toxisch ist.

Da es sich bei DON um eine phytotoxische Substanz handelt, liegt die Vermutung nahe, daß DON eine Rolle im Wirt/Parasit-System spielt. DON ist wie alle Trichothecene ein nicht-wirtsspezifisches Toxin und daher kann definitionsgemäß ausgeschlossen werden, dass DON ein Pathogenitätsfaktor ist (MITCHELL 1984). Das wird durch Ergebnisse aus der Literatur bestätigt, denn auch Defekt-Transformanten von *F. graminearum*, die kein DON bilden konnten, waren nach wie vor zu einer erfolgreichen Infektion in der Lage (DESJARDINS *et al.* 1996). Allerdings verursachten die Stämme schwächere Symptome als der Wildtyp (HARRIS *et al.* 1999, EUDES *et al.* 2001).

In der jüngeren Literatur besteht weitgehend Einigkeit darüber, dass DON neben weiteren Faktoren eine wichtige Rolle für die Aggressivität von *F. graminearum* spielt (GANG *et al.* 1998, MIEDANER *et al.* 2000, BAI *et al.* 2001, MESTERHAZY 2002), vermutlich als Aggressivitätsfaktor. ADAMS UND HART (1989) konnten diese Meinung nicht teilen, da durch Protoplastenfusion hergestellte nicht Trichothecen bildende Stämme trotzdem die Aggressivität des Wildtyps aufwiesen. Obwohl dieses Ergebnis eine Ausnahme darstellt, weisen PROCTOR *et al.* (1995) bei einem Vergleich verschiedener Getreide-Arten darauf hin, dass die Bedeutung von DON vom jeweiligen Wirt abhängt. Offenbar bedarf diese komplexe Fragestellung trotz weitgehendem grundsätzlichen Konsens weiterer Untersuchungen.

Die Korrelation der *in vitro*-Toxinproduktion verschiedener *Fusarium*-Isolate mit der Aggressivität in einem Biotest oder in Ähren-Inokulationen war meist nicht signifikant (GILBERT *et al.* 2001, WALKER *et al.* 2001). Der Grund hierfür könnte in einer Nicht-Beachtung anderer Mykotoxine liegen, denn GILBERT *et al.* (2001) ignorieren ZON, WALKER *et al.* ADON.

MCLEAN (1996a) weist jedoch darauf hin, dass für die Phytotoxizität von Mykotoxinen nicht nur additive, sondern auch synergistische Effekte auftreten können (DON und ZON). In einigen Arbeiten wurden sämtliche B-Trichothecene und ZON gemeinsam untersucht (LOGRIECO *et al.* 1990) und ebenfalls keine Korrelation gefunden; allerdings wurden nur neun *F. graminearum*-Isolate verwendet. Eine Untersuchung einer größeren Zahl von *F. graminearum*-Isolaten unter Berücksichtigung der Typ B-Trichothecene und von ZON könnte hier zur weiteren Klärung beitragen.

Miedaner und MIEDANER UND PERKOWSKI (1996) konnten einen starken Einfluß der Umweltbedingungen (Faktor Versuchsjahr) auf die Korrelationen zwischen Befall und DON-Gehalt beobachten. Für die hohe Komplexität der Interaktionen in Feldversuchen spricht auch das Ergebnis von COONEY *et al.* (2001), die einen Einfluß antagonistischer Mikroorganismen auf die Trichothecenbildung nachweisen konnten. Ein vereinfachter Versuchsansatz unter kontrollierten Klima-Bedingungen (Pflanzenwuchsschrank) könnte hier durch eine Vereinfachung des Systems zur Klärung grundsätzlicher Zusammenhänge beitragen.

LEMMENS *et al.* (1997) konnten in einer Ähren-Inokulation mit *F. culmorum* an 108 Weizen-Genotypen zeigen, dass die visuelle Bonitur zu verschiedenen Zeitpunkten (10 dpi bis 26 dpi) eine Korrelation unterschiedlicher Qualität zum DON-Gehalt ergab. Ähnliche Untersuchungen für verschiedene *F. graminearum*-Isolate sind nicht bekannt. Besonders weil viele Arbeiten sowohl für eine starke räumliche (Verlagerung des Toxins in der Ähre, SNIJDERS UND KRECHTING 1992, KANG UND BUCHENAUER 1999) als auch zeitliche Dynamik (Verlauf der Toxinbildung, SCOTT *et al.* 1984) sprechen, wäre aber eine Untersuchung verschiedener *F. graminearum*-Isolate gerade auch in Hinblick auf diese Dynamik dringend erforderlich.

GANG *et al.* (1998) ziehen aus ihren Ergebnissen den Schluß, dass es neben der Ernte andere Zeitpunkte der Pathogenese geben könnte, zu denen eine engere Korrelation zwischen den Parametern DON-Gehalt und Aggressivität besteht, also DON eine wichtigere Rolle spielt. Ergebnisse hierzu sind allerdings nicht bekannt.

Die Fähigkeit von Pflanzen, DON zu metabolisieren wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (MILLER UND ARNISON 1986, SCHUSTER 1988, YAO *et al.* 1996). Daher erschien es sinnvoll, den Verlauf der Pathogenese und des DON-Gehalts auch an Pflanzen verschiedener Resistenz gegen *Fusarium* zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden folgende sich daraus ergebende Fragestellungen bearbeitet:

- Wie müsste ein HPLC-Gradient zur Trennung möglichst vieler Mykotoxine beschaffen sein?

Es ist eine leistungsfähige HPLC-Methode zu etablieren, mit der ein möglichst breites Spektrum an Mykotoxinen (Typ-B Trichothecene und ZON) in einem Messlauf analysiert werden kann.

- Wie korrelieren die Toxinbildung *in vitro* und die Aggressivität in einem Keimlingstest?

Das Toxinbildungs-Potential einer größeren Anzahl *F. graminearum*-Isolate ist *in vitro* unter Berücksichtigung der Trichothecene vom B-Typ und ZON zu untersuchen. Die Aggressivität dieser Isolate sollte in einem möglichst einfachen und zugleich naturnahen Biotest quantifiziert und mit dem Toxinbildungs-Potential korreliert werden. Nur wenn auch bei Berücksichtigung aller bekannten wichtigeren Mykotoxine keine Korrelation gefunden werden sollte, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem methodischen Problem der mangelnden Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Verhältnisse ausgegangen werden.

- Bestehen Korrelationen zwischen dem DON-Gehalt und dem Befall (Ähren-Inokulationen) und ergeben sich Hinweise auf weitere die Aggressivität beeinflussende Faktoren?
- Zwischen welchen Parametern des DON-Gehalts, Befalls und Ertrags (Ähren-Inokulationen) bestehen die engsten Korrelationen?

Für mehrere *F. graminearum*-Isolate unterschiedlicher Aggressivität sollten Ähren-Inokulationen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden, um den Einfluß der in Feldversuchen komplexen Umweltfaktoren zu minimieren und klare Antworten zu erhalten, welche Korrelationen zwischen den Parametern bzw. Parameter-Gruppen DON-Gehalt, Befall und Ertrag bestehen. So sollte auch *in vivo* die mögliche Rolle von DON als Aggressivitätsfaktor untersucht werden und zugleich die Übertragbarkeit der Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen auf die *in vivo*-Verhältnisse getestet werden.

- Besteht ein Zusammenhang zwischen der zeitlichen Entwicklung des DON-Gehalts und der Aggressivität eines Isolats?
- Gibt es zu einem Zeitpunkt der Pathogenese eine besonders enge Korrelation zwischen DON-Gehalt und Aggressivität?

Die Entwicklung des DON-Gehalts und des Befalls soll in einer künstlichen Ähren-Inokulation erstmals für verschiedene *F. graminearum*-Isolate untersucht werden. Besonderes Interesse gilt der Frage, ob sich aggressivere Isolate in ihrer Dynamik des DON-Gehalts von der anderer Isolate unterscheiden. Weiterhin ist zu klären, ob die Korrelation zwischen DON-Gehalt und Aggressivität zu bestimmten Kardinalpunkten der Pathogenese besonders deutlich ist und so für folgende Arbeiten ein bestimmter Zeitpunkt der Probenahme zu empfehlen wäre.

- Ergeben sich unter Verwendung resistenter Sorten hinsichtlich Pathogenese und DON-Gehalt vergleichbare Ergebnisse?

In einem weiterführenden Versuch soll getestet werden, inwieweit Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen für *Fusarium*-Isolate verschiedener Aggressivität und Weizensorten verschiedener Resistenz besteht. Dies gilt sowohl für den Verlauf, als auch die Unterschiede zwischen den Sorten. Besonders interessant wären hier Hinweise auf einen DON-Metabolismus durch resistenterer Weizensorten.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Saatgut, Substrat und Dünger

Beim verwendeten Saatgut handelte es sich um nicht gebeiztes Versuchssaatgut, das direkt vom jeweiligen Züchter bezogen wurde. In den meisten Versuchen wurde die kurzstrohige Sommerweizen-Sorte "Picolo" verwendet, in einem Versuch die begrannte südamerikanische Sommerweizen-Sorte "Frontana" und in der Wirtspassage die Winterweizensorte "Renan". Picolo weist eine mittlere Anfälligkeit gegen Ährenfusariosen auf, Frontana gilt als resistent (MILLER UND ARNISON 1986) und Renan ist gering anfällig (genauere Angaben zu den Sorten siehe Anhang A.6). Wo nicht anders erwähnt, wurden die Pflanzen in Einheitserde (ED 73, siehe Anhang A.3) angezogen. Zum Düngen wurde der Flüssigdünger Wuxal-Super verwendet (N-P-K 8-8-6, Schering AG, siehe Anhang A.3).

2.1.2 Oberflächensterilisation

Vor der Aussaat wurden die Karyopsen einer Oberflächensterilisation unterzogen, um eine Beeinträchtigung durch der Karyopse anhaftende Saprophyten oder Pathogene zu vermeiden.

2.1.2.1 Oberflächensterilisation zur Anzucht

Die Körner wurden für 30 Min. auf dem Magnetrührer in einer Natriumhypochlorit-Lösung (Chlorbleichlauge, 0,2 % aktives Chlor, 0,05 % Tween 80) sterilisiert, anschließend erst für 15 Sekunden in 70% Ethanol und dann viermal in sterilem dest. Wasser gespült. Nach einer kurzen Trocknungsphase erfolgte die Aussaat. Mit dieser Methode konnte die Keimzahl bei gleichzeitiger Erhaltung einer sehr guten Keimungsrate (90 - 100 %) reduziert werden.

2.1.2.2 Oberflächensterilisation für sterile Arbeitsmethoden

Bei axenischen oder monoxenischen Arbeitsmethoden wie beispielsweise der Wirtspassage wurde eine radikalere Methode zur Oberflächensterilisation verwendet, bei der eine deutlich höhere Reduktion der Keimzahl zulasten der Keimungsrate (70 - 80 %) erzielt wurde. Zusätzlich zu dem unter 2.1.2.1 beschriebenen Verfahren wurden zwei weitere Schritte vorausgeschaltet. Die Körner wurden für 10 Min. auf dem Magnetrührer in vergälltem Ethanol (70 %,

0,05 % Tween) sterilisiert, anschließend für 15 Min. auf dem Magnetrührer in sterilem dest. Wasser gespült. Nun folgte das unter 2.1.2.1 beschriebene Verfahren.

2.1.2.3 Oberflächensterilisation zur Reisolation bei der Wirtspassage

Bei diesem vergleichsweise schonendem Verfahren sollte in jedem Fall vermieden werden, dass der im Wirt wachsende zur Isolation vorgesehene Erreger geschädigt wurde. Die Pflanzenteile wurden für nur 10 Min. auf dem Magnetrührer in einer Natriumhypochlorit-Lösung (Chlorbleichlauge, 0,2 % aktives Chlor, 0,03 % Tween 80) sterilisiert, anschließend kurz mit sterilem dest. Wasser gespült.

2.2 Pilzmaterial und Standard-Inkubation

Die *Fusarium*-Isolate wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auf Agar bezogen oder selber isoliert (Anhang A.6). Bei den Eigenisolaten erfolgte die taxonomische Einordnung morphologisch mit Hilfe der Literatur von BOOTH (1971) und GERLACH UND NIRENBERG (1982). Außer den Isolaten 44, 45 und 46 (allgemein Sektion Discolor) wurden alle Isolate von den Bezugsquellen als *F. graminearum* deklariert. Diese Einordnung wurde mit PCR-Technik überprüft (2.4).

Insgesamt wurden 54 *Fusarium*-Isolate verwendet (Tab. 2.1). In den meisten Versuchen wurde mit vier Einsporisolaten mit Wirtspassage gearbeitet, die zu Beginn der Arbeiten aus den wenigen schon zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Isolaten willkürlich ausgewählt worden waren (Isolate 34 bis 37).

Isolate, mit denen eine Wirtspassage durchgeführt worden war, wurden in dieser Tabelle mit dem Zusatz "WP" versehen.

Falls nicht anders erwähnt, wurden für die mykologischen Arbeiten Standard-Petrischalen (92 x 16 mm) verwendet und die Inkubation beimpfter Agar-Platten wurde im Brutraum (dunkel) bei etwa 23 °C vorgenommen. Die Petrischalen wurden mit Laborfilm verschlossen (Parafilm) (siehe Anhang A.4).

Tabelle 2.1: Herkunft der verwendeten Isolate.

Nr.	Wirt	Ort	isoliert am	Bemerkungen
L8hbWP (34)	Mais, Stängel	Niederbayern	96 oder 97	wie 30, aber mit Wirtspassage
L10eWP (35)	Mais, Stängel	Niederbayern	96 oder 97	wie 31, aber mit Wirtspassage
4527bWP (36)	Mais	unbekannt	85 oder 86	wie 32, aber mit Wirtspassage
G2.2aWP2 (37)	Miscanthus, Triebgrund	Forchheim	3/94	wie 33, aber mit Wirtspassage
1 bis 13	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
14 bis 16	Weizen, Korn	Selm-Born	99	-
17 bis 19	Weizen, Korn	Schwartbuck	99	-
20 bis 29	Weizen, Korn	Dornburg/Steudnitz	99	-
30	Mais, Stängel	Niederbayern	96 oder 97	Einsporisolat
31	Mais, Stängel	Niederbayern	96 oder 97	Einsporisolat
32	Mais	unbekannt	85 oder 86	Einsporisolat
33	Miscanthus, Triebgrund	Forchheim	3/94	Einsporisolat
38	unbekannt	Niederbayern	85 oder 86	Einsporisolat
39	Weizen/Blattscheide	Mering	92	Einsporisolat
40	Mais	unbekannt	85 oder 86	-
41	Weizen, Ähre	Tasdorf	7/98	-
42	Weizen (Bandit), Ähre	Wolfenbüttel	7/98	Einsporisolat von gleicher Ähre wie 43 ?
43	Weizen (Bandit), Ähre	Wolfenbüttel	7/98	-
44	Gerste, Halmbasis	unbekannt	1/99	-
45	Gerste, Halmbasis	unbekannt	1/99	-
46	Gerste, Halmbasis	unbekannt	1/99	-
47	unbekannt	Jugoslawien	unbekannt	1/00 erhalten
48	unbekannt	Jugoslawien	unbekannt	1/00 erhalten
49	Mais	unbekannt	85 oder 86	weitere Informationen siehe Anhang A.6
50	Mais	unbekannt	85 oder 86	s. o.
51	unbekannt	unbekannt	unbekannt	s. o.
52	unbekannt	unbekannt	unbekannt	s. o.
53	unbekannt	unbekannt	unbekannt	s. o.
54	unbekannt	unbekannt	unbekannt	s. o.

2.3 Mykologische Methoden

2.3.1 Nährmedien und Substrate

Alle Nährmedien und Substrate wurden autoklaviert (mindestens 15 Min., 121 °C, 1000 hPa Überdruck). War eine mikroskopische Beobachtung auf den Agar-Platten beabsichtigt, so wurde Agar der Qualitätsstufe "hochrein" verwendet. Folgende Nährmedien und Substrate wurden verwendet (nähere Angaben im Anhang A.3):

SNA/SN-Boullion (verändert nach NIRENBERG 1976):

Bei SNA handelt es sich um ein sehr nährstoffarmes, fast farbloses Medium, auf dem *Fusarium* nur langsam wächst. Er fördert die Sporulation und die Ausbildung typischer morphologischer Strukturen.

Der pH-Wert des SNA lag vor dem Autoklavieren bei 5,0-5,2.

Die Flüssigkultur (SN-Boullion) entsprach SNA ohne Agar-Anteil.

PDA/PDB:

Bei PDA (potato dextrose agar) handelt es sich um ein nährstoffreiches Medium, auf dem reichlich Luftmyzel und charakteristische Pigmente gebildet werden.

Der pH-Wert des PDA lag vor dem Autoklavieren bei 5,6-5,7.

Die Flüssigkultur (PDB) entsprach PDA ohne Agar-Anteil.

Wasseragar:

Wasseragar (mit 0,1 mmol/l CaSO₄) wurde immer dann verwendet, wenn nur ein sehr kurzes Wachstum der Pilze vorgesehen war oder er als steriles Saatbett für Weizenkörner diente.

Substrat für die *in vitro* Toxinproduktion:

Für die Versuche zur Toxinproduktion *in vitro* wurde geschälter, geschroteter Reis verwendet.

2.3.2 Bestimmung der Sporendichte

Zur Bestimmung der Sporendichte von *Fusarium* oder etwaigen Kontaminanten wurde eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer ("Assistent", Tiefe: 0,2 mm) verwendet. Es wurde der Mittelwert aus vier Zählungen verwendet.

Bei einer Sporendichte unter 100.000/ml wurden von dem Gesamtzählfeld fünf mittelgroße Felder (Kantenlänge 1 mm) ausgezählt (die vier Felder entlang der Hauptdiagonalen und ein separat liegendes). Die Gesamtzahl ergab in diesem Fall direkt die Sporenzahl pro ml.

Bei einer Sporendichte über 100.000/ml wurden von dem Gesamtzählfeld (Kantenlänge 4 mm) nur 25 Kleinfelder (Kantenlänge 0,2 mm) ausgezählt, und zwar jeweils fünf Kleinfelder in jedem der oben erwähnten fünf mittelgroßen Felder. Eine Multiplikation mit 3200 ergab die Sporenanzahl pro ml.

Da die Sporendichten nach dem Verdünnen auf den gewünschten Wert nicht erneut ausgezählt wurden, wurde die Zuverlässigkeit dieser Methode getestet. Bei einem Sollwert von 500000 Sporen/ml ergaben 14 unabhängige Zählungen einen Mittelwert von 507000 Sporen/ml. Alle Ergebnisse lagen zwischen 400000 und 600000 Sporen/ml. Der Variationskoeffizient betrug 9,8 %.

2.3.3 Kryokonservierung

Um eine konstante Qualität der Pilz-Kulturen zu gewährleisten, wurden Sporensuspensionen der jeweiligen Isolate kryokonserviert. Bei Verknappung des Vorrats wurden diese Isolate dann nach einem notwendigen Vermehrungsschritt erneut kryokonserviert.

Zur Konservierung wurden bewachsene SNA-Platten mit guter Sporulation mit jeweils 10 ml steriler Magermilchlösung (10 %, siehe Anhang A.1) abgeschwemmt. Jeweils 1,5 ml der Suspension wurden dann in die Kryoröhrchen (Nalgene; Sarstedt) pipettiert. Diese wurden dann mit Hilfe des Kryogeräts (Nicoool LM10, Air Liquide, France) über flüssigem Stickstoff schonend eingefroren und bis zum Gebrauch bei - 70 °C gelagert.

2.3.4 Herstellung von Einsporisolaten

Von den vier Haupt-Isolaten und einigen weiteren wurden Einsporisolate hergestellt. Die Einsporisolate sollten möglichst homogenes Pilz-Material und eine sichere taxonomische Einordnung gewährleisten.

Eine verdünnte Sporensuspension des gewünschten Isolats (Sporulation auf SNA) wurde hergestellt und mit einer Impföse auf einer SNA-Platte ausgestrichen. Nach kurzer Inkubation wurden gekeimte Sporen einzeln ausgestochen (Korkbohrer) und die Agar-Stückchen revers

auf eine frische SNA-Platte gelegt. Nach 20 Stunden wurden die Platten erneut auf Kontaminationen oder weitere Sporen geprüft. So wurden von jedem Isolat etwa fünf Einsporisolate hergestellt. Zwei dieser Isolate wurden durch Überimpfen auf SNA-Platten weitervermehrt und dann bei ausreichender Sporulation kryokonserviert, während die anderen Einsporisolate eines Isolats als SNA-Platten als Reserve bei 4 °C im Brutraum gelagert wurden.

2.3.5 Wirtspassage

Da die verschiedenen Isolate schon unterschiedlich lange im Labor gehalten worden waren und sich auch in der Herkunft unterschieden, wurden wenigstens die Isolate einer Wirtspassage unterzogen, mit denen hauptsächlich gearbeitet werden sollte.

Oberflächensterilisierte Weizenkörner (Sorte Renan) wurden auf Wasser-Agar (WA8C) in Petrischalen (etwa fünf Körner pro Schale) ausgesät und keimten im Dunkeln (23 °C). Am selben Tag erfolgte das Animpfen von PDA-Platten mit den entsprechenden Isolaten.

Nach drei bis vier Tagen wurden die gekeimten Körner, die makroskopisch unkontaminiert waren, in sterile Plastikschalen (500 ml, mit etwa 50 ml WA8C gefüllt) vereinzelt und weiter im Dunkeln bei 23 °C gehalten.

Nach weiteren drei bis vier Tagen (sieben Tage nach Aussaat) wurden die Keimlinge nochmals auf Kontaminanten überprüft und mit *F. graminearum* inokuliert. Als Inokulum diente das entsprechende auf PDA gewachsene Isolat (Alter: sieben Tage). Hierzu wurde ein bewachsenes Agar-Scheibchen (ca. 8 mm Durchmesser) mit Korkbohrer ausgestochen und direkt an der Sprossbasis der Pflanze plaziert. Pro *Fusarium*-Isolat wurden mindestens vier Keimlinge inokuliert.

Nach etwa sieben Tagen wurde der Erreger reisoliert. Die befallene Stängelbasis wurde mit einem sterilen Skalpell abgetrennt, gemeinsam mit den anderen Wiederholungen desselben Isolats oberflächen-sterilisiert (2.1.2.3) und jedes Stück auf einer SNA-Platte ausgelegt. Die Inkubation erfolgte wiederum im Dunkeln bei 23 °C.

Nach weiteren sieben Tagen (bei Isolat 33/37 erst nach fünf Wochen) wurde nach mikroskopischer Kontrolle eines der Re-Isolate ausgewählt, zur Vermehrung auf mehrere SNA-Platten überimpft und diese Platten weiter inkubiert. Das Isolat wurde dann nach zwei bis vier Wochen kryokonserviert.

2.4 Taxonomische Einordnung mittels PCR

Da besonders bei der Gattung *Fusarium* eine taxonomische Einordnung aufgrund morphologischer Kriterien alleine auch von langjährigen Experten nicht zweifelsfrei möglich ist, wurde in Ergänzung eine bereits im Institut etablierte Methode zur molekularbiologischen Charakterisierung der Isolate durchgeführt. Die genomische DNA der Isolate wurde einer PCR unterzogen, in der pathogenspezifische Primer verwendet wurden. Nur wenn DNA des entsprechenden Pathogens vorlag, wurde DNA amplifiziert und kam es zu einem Signal auf Höhe der Kontrollbande im Agarose-Gel.

2.4.1 Anzucht des Pilzmaterials

Das Pilzmaterial zur Gewinnung der DNA wurde in Flüssigkultur angezogen. Hierzu wurden 50 ml PDB in 200 ml-Erlenmeyerkolben autoklaviert und pro Isolat 2 Kolben mit je 500 µl kryokonservierter Sporensuspension beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 23 °C im Dunkeln auf einem Schüttler (Edmund Bühler, SM 25 Swip) mit ca. 40 rpm. Nach 5-8 Tagen wurde je Isolat ein Aliquot Myzel entnommen und davon 200 mg Frischmasse in 2,0 ml Reaktionsgefäßen eingewogen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit einer Spatelspitze Quarzsand versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung über flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.2 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Ein Teil der Isolate wurde aus finanziellen Gründen mit dem kostengünstigeren E.Z.N.A (Fungal DNA Mini Kit, peQLab) bearbeitet.

2.4.2.1 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Isolate 1-5, 37-54)

Nach kurzem Antauen und Zugabe von Puffer wurde das Material mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert (Heidolph RZR 2020, Teflon-Stab, höchste Drehzahl) und für 10 Min. bei 65 °C inkubiert. Auf einen RNase-Verdau wurde verzichtet, da er für die Fragestellung nicht relevant war und so Kosten gespart werden konnten. Die Proben wurden für 5 Min. auf Eis inkubiert, zentrifugiert (20800 x g, 5 Min.) und der klare Überstand abpipettiert. Wegen starker Trübung musste dieser Schritt zweimal wiederholt werden, bis der Überstand klar war.

Dann wurde ein Aliquot des Überstands auf die Säule (mini column) gegeben, und die DNA an die Säule gebunden. Die Säule wurde zweimal gewaschen, kurz getrocknet, mit Elutionspuffer (65 °C) für 5 Min. inkubiert und anschließend die DNA zweimal eluiert. Die DNA wurde vorerst bei 4 °C und später bei -20 °C gelagert.

2.4.2.2 E.Z.N.A (Fungal DNA Mini Kit, peQLab) (Isolate 6-29, 34-36)

Generell entsprach das Verfahren dem unter 2.4.2.1 beschriebenen. Es folgte Kurzprotokoll (Handbuch). Der einzige prinzipielle Unterschied bestand darin, dass vor der 10 minütigen Inkubation bei 65 °C zu jedem Ansatz 10 µl Mercaptoethanol gegeben wurden.

2.4.3 PCR (polymerase chain reaction)

2.4.3.1 Ansetzen des Reaktionsgemisches

Hierbei wurde aus den einzelnen Komponenten ein Mastermix angesetzt (Tab. 2.2

Tabelle 2.2: Pipettierschema für die Reaktionsansätze der PCR.

	Hersteller	µl je Ansatz
Reinstwasser	Millipore	35,05
Reaktionspuffer (10fach konz.)	Promega	5,00
MgCl ₂ (25 mM)	Promega	3,00
dNTPs (10 mM)	Promega	0,25
Primer forward (10 µM)	MWG Biotech	0,75
Primer reverse (10 µM)	MWG Biotech	0,75
Taq-Polymerase (5 U/µl)	Promega	0,20
Summe Mastermix		45,00
Ziel-DNA		5,00
Summe Ansatz		50,00

Hiervon wurden dann entsprechende Aliquots (45 µl) in die einzelnen Reaktionskammern pipettiert und durch Zugabe der jeweiligen DNA komplettiert.

2.4.3.2 Die PCR-Inkubation

Die PCR wurde mit einem Thermo-Cycler (MWG Biotech Primus 96 plus) in 96 well PCR-plates durchgeführt. In Abhängigkeit vom jeweiligen primer wurden verschiedenen Programme gewählt (siehe Tab. 2.3 und Anhang A.7).

Tabelle 2.3: Primer und PCR-Produkte (weitere Angaben im Anhang A.7).

Primer	Spezifität für	Produkt-Größe (bp)
Fg-11f/r	<i>F. graminearum</i>	300
Fc-35f/r	<i>F. culmorum</i>	472
Faf/r	<i>F. avenaceum</i>	920
Fp-82f/r	<i>F. poae</i>	250

Nach Beendigung der Reaktion wurde zu den 50 µl PCR-Produkt 10 µl Farbstoff (Dye-Stammlösung aus Orange G und Bromphenolblau, siehe Anhang A.2) gegeben und die PCR-Produkte bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Elektrophorese

Durch Agarose-Gel-Elektrophorese wurde zum einen der Ertrag der DNA-Isolierung kontrolliert, zum anderen die Retention der durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente mit der der jeweiligen Kontrolle verglichen.

Die Elektrophorese erfolgte in mit TAE-Puffer gefüllten Gelkammern (BIO-RAD) mit Gelen verschiedener Dimensionen je nach Anwendung und Probenzahl (7x6 cm, 10x6 cm, 10x15 cm, 15x15 cm) bei einer Spannung von etwa 5 V/cm für 60-90 Min. (Netzgerät BIO-RAD Power Pack 300).

Bei großen Gelen (15 cm Länge) wurden nach etwa 45 Min. nochmals 20 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) in die Anoden-Gelkammer gegeben, um ein Ausbleichen der DNA-Banden am unteren Ende des Gels zu verhindern.

2.4.4.1 DNA-Gele

Für die Überprüfung des DNA-Ertrags der Isolierung wurden in der Elektrophorese 10 µl der DNA-Lösung eingesetzt. Als Standard dienten 50 ng lambda-DNA (5 µl der Stammlösung (10ng/µl), Anhang A.2).

DNA-Gel: - 100 ml TAE-Puffer
 - 1 g Agarose
 - 5 µl Ethidium-Bromid-Stammlösung (10 mg/ml)

2.4.4.2 PCR-Gele

Um die Retentionszeiten der PCR-Produkte mit denen der Standards zu vergleichen, wurden 20 µl des PCR-Produktes auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker dienten 5 µl der 100 bp ladder 3k (entspricht 417 ng DNA, siehe Anhang A.2). Als Standards dienten die PCR-Produkte folgender Kontroll-Isolate (Tab. 2.4; Herkunft siehe Anhang A.6):

Tabelle 2.4: Kontroll-Isolate für die PCR.

Bezeichnung	<i>Fusarium</i> -Art
G.2.1	<i>F. graminearum</i>
L5/97	<i>F. culmorum</i>
G3.1	<i>F. avenaceum</i>
G4.1	<i>F. poae</i>

Bezeichnung	<i>Fusarium</i> -Art
G6.1	<i>F. tricinctum</i>
G7.1	<i>F. sambucinum</i>
G8.1	<i>F. flocciferum</i>
G9.1	<i>F. anthophilum</i>

PCR-Gel:	- 100 ml	TAE-Puffer
	- 1,5 g	Agarose
	- 5 µl	Ethidium-Bromid-Stammlösung (10 mg/ml)

2.4.5 Gel-Dokumentation

Direkt nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele auf einen UV-Leuchttisch (Appligene oncor Transilluminator Model M 20) ausgelegt und fotografiert. Diese Bilder wurden mit Hilfe eines Computer-gestützten Auswertungssystems (Appligene oncor) archiviert (als TIF-Datei).

2.5 *In vitro*-Toxinbildung

Zur *in vitro*-Toxinbildung von *Fusarium* auf geschrotetem Reis wurden zwei Versuche durchgeführt. Im ersten wurde der Verlauf der Toxinbildung von vier bekannten *Fusarium graminearum*-Isolaten untersucht, im zweiten Versuch wurde ein Screening der Toxinbildung von allen verwendeten *Fusarium*-Isolaten durchgeführt.

2.5.1 Versuch zum Verlauf der Toxinbildung

2.5.1.1 Vorbereitung des Substrats

2,25 kg Reis wurden in einem Trockenschrank (memmert U 40) getrocknet (für 3 Tage bei 60 °C (belüftet) und für 3 Stunden bei 105 °C (unbelüftet)) und zum Schroten (La moulINETte, type D 56, Moulinex, für 5 Sekunde bei voller Drehzahl) portionsweise entnommen (100 g-200 g).

Je 10 g Reis wurden nun in 50 ml-Falcon-Röhrchen eingewogen und mit 6,67 ml dest. Wasser pro Röhrchen auf 40 % Feuchte eingestellt. Durch Anschlägen mit einem Spatel wurde die Oberfläche des Substrats vergrößert. Die Röhrchen wurden mit Alufolie verschlossen und an zwei aufeinander folgenden Tagen zweimal autoklaviert (20 Min., 121 °C, 1000 hPa Überdruck, Webeco).

2.5.1.2 Vorbereitung des Inokulums

Zum Beimpfen der Röhrchen wurden die kryokonservierten Sporensuspensionen verwendet (2.3.3). Die Suspensionen folgender 4 Isolate wurden auf 20000 Sporen/ml verdünnt: Isolat 34, 35, 36 und 37.

2.5.1.3 Inkubation und Probennahme

Die Röhrchen wurden mit 100 µl der jeweiligen Sporensuspension beimpft (2000 Sporen/Röhrchen) und die Kontrollen mit 100 µl autoklavierter Magermilchl sung versetzt. Die Kontroll-Ansätze wurden erstens benötigt, um eine eventuelle Kontamination des Reis mit Mykotoxinen festzustellen und zweitens, um das Ergebnis um matrixinterne Störpeaks zu korrigieren. Zusätzlich zur Alufolie wurden die Röhrchen mit Laborfilm (Parafilm) verschlossen, um ein Austrocknen über die teils lange Inkubation zu verhindern. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (Ehret Nr. 3155) im Dunkeln bei 27 - 28  C.

Die Probenahme erfolgte zu 9 verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubationsbeginn (3, 6, 10, 14, 21, 27, 35, 44 und 56 dpi). Ein Probenstag umfasste je drei Parallelansätze der vier Isolate und eine Kontrolle. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme eingefroren, gefriergetrocknet und wie unter 2.8 beschrieben direkt weiter bearbeitet.

Hierbei zeigte Isolat 36 etwas andere Extraktionseigenschaften als die drei übrigen Isolate. In der Quellbarkeit entsprachen diese Proben eher der Kontrolle als den Proben der drei übrigen Isolate.

2.5.2 Screening-Test der Toxinbildung

2.5.2.1 Vorbereitung des Substrats

3,5 kg Reis wurden bereitgestellt und an mehreren Aliquots (zehnmal 100 g) der Wasseranteil durch Trocknung bestimmt (memmert U 40; für 3 Tage bei 60  C (belüftet) und für 3 Stunden bei 105  C (unbelüftet)). Der Wassergehalt betrug 8,6 %. Daraus ergab sich, dass bei einem gewünschten Wassergehalt von 40 % und 10 g Trockenmasse genau 10,9 g Reis eingewogen und mit 5,73 ml dest. Wasser versetzt werden mussten. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten wie unter 2.5.1.1 beschrieben.

2.5.2.2 Vorbereitung des Inokulums

In diesem Versuch wurden alle in Tab. 2.1 genannten *Fusarium*-Isolate untersucht. Hierzu wurden PDA-Platten beimpft. Da noch nicht alle der Isolate zu diesem Zeitpunkt kryokonserviert waren, musste bei einigen Isolaten zum Beimpfen der PDA-Platten auf alte Agar-Platten oder Schrägagar-Röhrchen zurückgegriffen werden. Da bei einigen der Isolate Kontaminationen vorlagen, wurden dort zur Dekontamination ein oder mehrere zusätzliche Subkultivierungs-Schritte eingeschoben. Zur Zeit des Versuchsbeginns betrug das Alter der Kolonien auf den PDA-Platten 7 (3) bis 10 Tage.

2.5.2.3 Inkubation und Versuchsende

In jedes Röhrchen wurde zum Animpfen ein aus der Inokulum-Platte (PDA) ausgestochenes Agar-Scheibchen (Korkbohrer, 10 mm) gelegt. Die Röhrchen wurden nun wieder mit Alufolie verschlossen und zusätzlich mit Laborfilm (Parafilm). In die Kontroll-Ansätze wurde ein unbewachsenes PDA-Scheibchen gelegt.

Pro Isolat wurden drei Röhrchen beimpft. Zwei davon waren als die später auszuwertenden Proben vorgesehen (möglichst gleichmäßige Verteilung des Reis; große Oberfläche). Das dritte Röhrchen, bei dem die Oberflächenvergrößerung des Substrats meist durch ein Abbröckeln während des Autoklavierens verlorengegangen war, war ursprünglich nur als Reserve gedacht, wurde dann aber als gleichwertige dritte Parallele behandelt.

Die Inkubation erfolgte ebenfalls in einem Brutschrank (Ehret Nr 3155) im Dunkeln bei 28 - 29 °C.

Der Versuch wurde nach 21 Tagen beendet. Alle Röhrchen wurden entnommen, kurz eingefroren, gefriergetrocknet (wegen der großen Menge für 96 Stunden statt 48 Stunden), und bis zur weiteren Bearbeitung im Exsikkator gelagert (2.8).

Die ersten beiden Parallelen aller Isolate (s.o.) wurden innerhalb von drei Wochen bearbeitet, die dritte Parallele erst nach etwa 6 Monaten Lagerung im Exsikkator (Anhang A.8).

2.6 Aggressivitätstest

Parallel zum Toxinbildungsvermögen wurde die Aggressivität aller 54 vorhandenen *Fusarium*-Isolate (Tab. 2.1) getestet, um auf einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen bei-

den Eigenschaften schließen zu können. Hierzu wurde ein Biotest etabliert, der am Ende einer mehrmonatigen Entwicklungsphase stand, in der mehrere andere Testverfahren aufgrund fehlendem Infektionserfolg, schlechter Auflösung oder mangelnder Reproduzierbarkeit hatten verworfen werden müssen.

In diesem Biotest wurden junge Weizen-Pflanzen an einer künstlichen Verwundung an der Sprossbasis inokuliert und die Befalls-Symptome der Pflanzen nach sieben Tagen bonitiert.

Pro Versuch wurden vier Isolate parallel getestet, wobei für jedes der Isolate vier Parallelen angelegt wurden. Zusammen mit der Kontrolle bestand ein Versuch also aus 20 Töpfen mit je maximal 25 Pflanzen. Für jedes der *Fusarium*-Isolate wurde dieser Versuch zweimal durchgeführt. Der Einsatz einer nicht inokulierten Kontrolle sollte ein Abschätzen eventuell auftretender Störgrößen ermöglichen (Sekundär-Infektion durch die Isolate benachbarter Töpfe oder andere Pathogene, versuchsbedingte Einflüsse).

2.6.1 Anzucht der Pflanzen

Das Saatgut (SW Picolo) wurde oberflächensterilisiert (2.1.2.1) und in eckige Pflanzttöpfe (9 cm Kantenlänge) zu 25 Körnern pro Topf ausgesät (im 5 x 5-Schema). Die Keimlinge wurden bis zum Versuchsbeginn nach sieben Tagen im Pflanzenwuchsschrank (Heraeus/Vötsch HPS 400) (20/13 °C; 14/10h) auf Kunststoff-Tablets (40 cm x 60 cm) angezogen und nach Bedarf gegossen. Um eine einheitliche Bestrahlung zu gewährleisten (seitlicher Lichteinfall), wurden die Töpfe nur in einer Reihe pro Regal aufgestellt. Die mittlere Bestrahlungsstärke (PAR, photosynthetisch aktive Strahlung) betrug bei neuen Leuchtmitteln $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (siehe Anhang A.5) .

Vor der Inokulation wurden die deformierten oder zu kleinen Keimlinge (erstes Laubblatt zum großen Teil noch nicht entwickelt) entfernt und die verbleibenden Pflanzen ein wenig gegossen.

2.6.2 Vorbereitung des Inokulums

Pro Agar-Platte wurden 100 μl der kryokonservierten Sporensuspension (2.3.3) auf 12 SNA-Platten je Isolat gegeben und mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Nach sechs bis acht Wochen Inkubation wurden die Platten zur Gewinnung des Inokulums genutzt.

2.6.3 Inokulation und Inkubation bis zur Bonitur

Sieben Tage nach der Aussaat erfolgte die Inokulation. Hierzu wurde ein Holz-Zahnstocher (Fackelmann) in eine definierte Sporensuspension getaucht und der Keimling damit an der Sprossbasis künstlich verletzt. Die folgenden Schritte wurden nacheinander für jedes Isolat beginnend mit der Kontrolle durchgeführt.

Herstellung der Sporensuspension: Pro Isolat wurden drei oder bei Bedarf mehr SNA-Platten mit je 3 ml Leitungswasser abgeschwemmt bzw. abgestrichen (Einweg-Rührstab, Sarstedt). Bei geringer Sporendichte wurden die 3 ml Suspension von der ersten Platte auf die folgenden gegeben, um einen Verdünnungseffekt zu vermeiden.

Einstellung der Sporendichte: Die Sporendichte wurde ausgezählt und mit Leitungswasser auf 500.000 Sporen/ml eingestellt (2.3.2). Das Endvolumen sollte etwa 10 ml betragen. Sollte diese Sporendichte bei einem der Isolate nicht erreicht worden sein, so wurde dieser niedrigere Wert notiert und bei diesem Isolat mit dieser Suspension geringerer Dichte inokuliert (Anhang A.10).

Inokulation: Der Zahnstocher wurde mit dem spitzeren Ende kurz in die Sporensuspension getaucht (Kontrolle: Leitungswasser). Der erste Keimling wurde nun knapp 1 cm über der Erdoberfläche angestochen, wobei der Spross durch den Zeigefinger der anderen Hand gestützt wurde. Der Spross wurde vollständig und möglichst mittig durchstochen. Vor jedem Einstich wurde der Zahnstocher neu in die Sporensuspension getaucht. Waren alle Keimlinge eines Topfes inokuliert, wurde der Topf mit Etikett markiert, eine Klarsichttüte (PP) über den Topf gestülpt und der Topf in den Pflanzenwuchsschrank (HPS 400) gestellt. Hierbei wurde ein Stellschema (siehe Anhang A.9) berücksichtigt, das möglichst gleiche Bestrahlung gewährleisten sollte. Diese Maßnahme war notwendig, da die Bestrahlungsstärke in der Mitte des Regals höher als am Rand war. Für jeden Topf wurde ein neuer Zahnstocher verwendet. Waren alle 4 Töpfe eines Isolats bearbeitet, folgte das nächste Isolat.

Die Inkubation bis zur ersten Bonitur nach sieben Tagen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie schon die Anzucht (2.6.1). Nach sechs Tagen wurde die Klarsichttüte von den Töpfen entfernt. Ein Gießen während dieser Zeit war nicht erforderlich.

2.6.4 Bonitur (7 dpi)

Die Bonitur erfolgte sieben Tage nach der Inokulation. Die Isolate wurden hierbei reihum bearbeitet, beginnend mit der ersten WDH (um einen Trend der Boniturnwerte zu vermeiden, da die Inokulation doppelt so lange wie die Bonitur dauerte).

Ausgewertet wurde das Symptom an der Sprossbasis nach **zwei Parametern**: "Länge der Verbräunung in mm" und "Stängelumfassung der Verbräunung in Klassen von 0-4".

Die **Länge der Verbräunung** wurde mit einem Lineal auf den Millimeter genau gemessen. Hierbei zählte jede kleine Verbräunung, auch wenn sie nicht direkt an die Haupt-Verbräunungslinie anschloss. Alle Verbräunungen wurden sozusagen auf eine Linie projiziert, die entlang der Sprossachse verlief.

Als Grad der **Stängelumfassung** wurde der Grad verstanden, in dem die Verbräunung den Spross umschloss. Auch hier zählte jede kleine Verbräunung. Evtl. in einer anderen Höhe auftretende Verbräunungen wurden hier ebenfalls in eine gemeinsame Ebene projiziert, diesmal in die Ebene eines Ringes um die Sprossachse. Die Einteilung erfolgte in fünf Klassen (Tab. 2.5).

Tabelle 2.5: Klasseneinteilung zur Bonitur der Stängelumfassung.

	Klasse 0	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4
Stängelumfassung (%)	0	$0 < x \leq 25$	$25 < x \leq 50$	$50 < x \leq 75$	$75 < x \leq 100$

2.7 Inokulation von Ähren

Die Ähren-Inokulationen wurden unter kontrollierten Bedingungen in zwei Pflanzenwuchsschränken (Heraeus/Vötsch HPS 2000) durchgeführt. Bei diesen Inokulationen mit *Fusarium graminearum* wurde zum einen der Befallsverlauf, zum anderen der Gehalt an DON über den gesamten Zeitraum von der Inokulation bis zur Reife erfasst. Untersucht wurden hierzu in der Regel Einzelähren, gelegentlich auch Ähren-Mischproben.

Insgesamt wurden vier Experimente vorgenommen. In den ersten beiden Experimenten wurden je zwei verschiedene Isolate an der SW-Sorte Picolo untersucht, im dritten Versuch alle

vier Isolate gemeinsam. Bei diesen Isolaten handelte es sich um die Isolate 34, 35, 36 und 37, die auch schon im Versuch zum Verlauf der Toxinbildung auf Reis verwendet worden waren. Im vierten Experiment wurde eines der vier bereits untersuchten Isolate an zwei verschiedenen SW-Sorten (Picolo und Frontana) untersucht (Tab. 2.6).

Diesen vier Ähren-Inokulationen war ein Vorversuch zur Ermittlung einer optimalen Sporendichte im Inokulum vorgeschaltet. Bei einer zu geringen Sporendichte würden Isolate schwächerer Aggressivität möglicherweise gar keine Symptome hervorrufen, bei einer zu hohen Sporendichte könnten die Unterschiede zwischen den Isolaten durch den zu hohen Befallsdruck aufgehoben werden. Die Ähren in diesem Versuch wurden mit verschiedenen Sporendichten eines Misch-Inokulums aus verschiedenen *F. graminearum*-Isolaten infiziert und bis 28 dpi bonitiert (Abb. 3.33). Weitere Informationen hierzu entnehme man dem Anhang A.10.

Tabelle 2.6: Die Ähren-Inokulationen 1 - 4 in der Übersicht.

	Isolate (<i>Fusarium graminearum</i>)	Sporen/ml	Sorte
1	34, 37	1×10^5	Picolo
2	35, 36	1×10^5	Picolo
3	34, 35, 36, 37	8×10^4	Picolo
4	35	8×10^4	Picolo, Frontana

2.7.1 Allgemeingültige Vorgehensweise der Inokulation der Ähren

Im folgenden Abschnitt sollen die Gemeinsamkeiten aller vier Versuche beschrieben werden, um anschließend noch auf die jeweiligen Unterschiede einzugehen.

2.7.1.1 Anzucht und Kulturmaßnahmen

Das Saatgut wurde kurz oberflächensterilisiert, die Körner zu mehreren in eckige Pflanztpöfe (Kantenlänge 9 oder 13 cm) ausgesät und nach ein bis zwei Wochen auf eine Pflanze pro Topf vereinzelt. Die Töpfe waren im Pflanzenwuchsschrank (HPS 2000, Fläche etwa $1,4 \text{ m}^2$,

(20/13 °C; 14/10h)) lückenlos aneinander gestellt, so dass ein geschlossener Bestand simuliert wurde. Je nach Topfgröße handelte es sich um 77 oder 160 Töpfe.

Die höhenverstellbare Lichtquelle wurde während der Anzucht in einem konstanten Abstand von der Pflanzen-Oberfläche von etwa 25 cm gehalten. Die mittlere Bestrahlungsstärke (PAR) betrug $416 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (siehe Anhang A.5). Da einige Ähren den Pflanzenbestand weit überragten, wurden während der Anzucht für solche Ähren Spitzenwerte von über $670 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreicht (10 cm Abstand vorausgesetzt). Das Gießen erfolgte anfangs nach Bedarf, später dreimal wöchentlich.

Nach einigen Wochen wurde begonnen, mehrmals mit Flüssigdünger zu düngen (4 ml pro $1,4 \text{ m}^2$; Flüssigdünger Wuxal Super; siehe Anhang A.3) und insgesamt wurde zwei- bis dreimal Wachstumsregler appliziert (Cycocel 720; etwa $2 \mu\text{g}$ Wirkstoff/Topf; siehe Anhang A.3).

Besonders zu fortgeschrittener Vegetation konnte ein Befall der Ähren mit Schwärze-Pilzen beobachtet werden.

2.7.1.2 Vorbereitung des Inokulums

Zur Vorbereitung des Inokulums wurden etwa vier Wochen vor der Inokulation pro Isolat fünf SNA-Platten beimpft, und zwar wurden $150 \mu\text{l}$ Sporensuspension direkt aus den Kryoröhrchen zentral auf jede Platte pipettiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für ein bis zwei Wochen inkubiert.

Die Anzucht des eigentlichen Inokulums erfolgte in SN-Boullion-Flüssigkultur. Hierzu wurden pro Isolat drei 500 ml-Erlenmeyer-Kolben mit jeweils 250 ml Medium befüllt und autoklaviert (121 °C, 1000 hPa Überdruck, Webeco). Diese Kolben wurden mit mehreren kleinen Agar-Scheibchen (Korkbohrer, 8-10 mm) einer SNA-Platte des entsprechenden Isolats beimpft und mit Alufolie verschlossen. Die Inkubation erfolgte auf einem Labor-Schüttler mit Inkubationshaube (Edmund Bühler SM-30 C Control mit TH 30) bei 23 °C und 80 rpm. Nach zwei (Versuche 1 bis 3) bis drei (Versuch 4) Wochen konnte das Flüssigmedium als Inokulum genutzt werden. Die Inkubation erfolgte bei UV-C-Dauerlicht (Versuche 1 und 2) bzw. Schwarzlicht (12 Stunden pro Tag, zweimal 8 Watt; Versuche 3 und 4).

2.7.1.3 Inokulation der Ähren

Die Inokulation erfolgte zur Vollblüte (Stadium EC 65, 12. Woche (Versuche 1 und 2) bis 13. Woche (Versuche 3 und 4) nach der Aussaat) möglichst nur an Haupttrieben. Inokuliert wurde durch ein Eintauchen der Einzelähren in eine definierte Sporensuspension. Eine Sprüh-Inokulation war wegen einer möglichen Vermischung der gemeinsam getesteten Isolate nicht möglich.

Da nur begrenztes Ährenmaterial zur Verfügung stand, wurden kurz vor der Inokulation geeignete Ähren mit einem farbigen Etikett zur Unterscheidung der Isolate markiert (pro Isolat 30 bis 50 Ähren), die in dem Pflanzenwuchsschrank gemeinsam getestet werden sollten. Die für die beiden Isolate vorgesehenen Ähren waren nicht durch Areal-Bildung oder anderweitig voneinander getrennt, sondern die Verteilung im Pflanzenwuchsschrank erfolgte möglichst gleichmäßig. Eine zusätzliche Nummerierung auf den farbigen Etiketten diente als Hilfe bei der späteren individuellen Bonitur der Ähren und der Probennahme. Zusätzlich wurden etwa 20 Kontroll-Ähren markiert. So konnte das Peak-Muster gesunder Weizen-Ähren mit dem inokulierten verglichen und das Ergebnis um matrixinterne Störpeaks korrigiert werden.

Am Tag der Inokulation wurden die Sporensuspensionen auf $0,8$ bzw. 1×10^5 Sporen/ml eingestellt. Hierzu wurden die Ansätze eines Isolats vereinigt, das Myzel mit Hilfe eines feinen Siebs entfernt und die Rohsuspensionen ausgezählt. Verdünnt wurde mit autoklaviertem Leitungswasser. Alle Isolate wurden auf diese Weise bearbeitet und erst dann begann die Inokulation. Pro Isolat standen 600 bis 800 ml Inokulum zur Verfügung, von denen aber nur etwa 400 ml benötigt wurden.

Die Inokulation ging in derselben Reihenfolge vonstatten, in der die Isolate auch ausgezählt worden waren, um Keimungs- oder Alterungseffekte der Sporen auszuschließen. Die Ähren wurden pro Isolat in numerischer Reihenfolge bearbeitet. Das Inokulum wurde in 85 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt. Mit einem Laborsprüher wurde jede Ähre von beiden Breitseiten einmal mit Leitungswasser benetzt und dann kopfüber und so vollständig wie möglich in die Sporensuspension getaucht. Anschließend wurde die Ähre mit einer kleinen Klarsicht-Tüte (PP) und Dreh-Draht verschlossen, um eine hohe relative Feuchte zu erzielen. Wo die Fahnenblattscheide störte, wurde sie etwas am Stängel herabgezogen. Nach etwa sieben Ähren wurde die Suspension im Zentrifugenröhrchen gewechselt. Die Kontroll-Ähren wurden mit reinem Leitungswasser behandelt.

Für die Zeit der Inokulation blieb das Licht eingeschaltet und die Temperatur bei 20 °C, auch wenn eigentlich schon die Nacht-Phase erreicht war. Im Anschluss an die Inokulation wurde wieder auf den normalen Tag/Nacht-Rhythmus umgeschaltet, allerdings bei Versuchen 3 und 4 bei 20 °C. Etwa 24 Stunden nach Inokulationsbeginn wurden die Kunststoff-Tüten von den Ähren entfernt und die Ähren sowie der gesamte Bestand mit Wasser benetzt. Erst jetzt wurde auch die Temperatur wieder der eigentlichen Phase des Zyklus angepasst. In den Versuchen 1, 2 und 3 wurden die Ähren auch noch in den folgenden Tagen gezielt befeuchtet.

Nach der Inokulation wurde die Lichtquelle nun generell in einem größeren Abstand von der Pflanzen-Oberfläche gehalten (ca. 50 cm), um ein starkes Erwärmen und Trocknen der inokulierten Ähren zu verhindern (Versuch 1: nur für eine Woche). Die mittlere Bestrahlungsstärke (PAR) betrug bei nun $337 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (siehe Anhang A.5).

2.7.1.4 Bonitur und Probennahme

Von der Inokulation bis zur Reife wurde in regelmäßigen Abständen der *Fusarium*-Befall der Ähren bonitiert und ebenfalls Proben zur Toxinanalyse entnommen.

Die Bonitur erfolgte individuell für die gekennzeichneten Ähren, und zwar zu Beginn mehrmals, am Ende nur noch einmal wöchentlich. Bonitiert wurde die Befallshäufigkeit der Ährchen (= Spindelstufen) (Formel 2.1).

$$\text{BH} = (n_{\text{b}\ddot{\text{A}}} / n_{\text{g}\ddot{\text{A}}}) \cdot 100 \quad \text{Formel 2.1}$$

BH = Befallshäufigkeit der Ährchen [in %]

$n_{\text{b}\ddot{\text{A}}}$ = Anzahl befallener Ährchen

$n_{\text{g}\ddot{\text{A}}}$ = Gesamtzahl der Ährchen dieser Ähre

Als befallen galt ein Ährchen dann, wenn auch nur die kleinsten Anzeichen einer Verbräunung zu erkennen waren. Dabei war unerheblich, wie stark der Befall dieses Ährchens war.

Sterile Ährchen wurden in der Berechnung nur in Versuch 1 und 2 berücksichtigt.

Ein reines Vergilben von Ährchen ohne erkennbare Symptome (Verbräunungen), sei es durch Abreife oder durch ein Absterben gesamter Ährenpartien (Notreife; bedingt durch Infektion der Spindel), wurde zwar separat bonitiert, aber in der Berechnung nicht als Befall mit berücksichtigt.

In Versuch 3 wurde zusätzlich berücksichtigt, wie stark der Befall der Ährchen war (7 dpi bis 35 dpi). Jedes Ährchen besteht in der Regel aus drei Blüten. Der Befall dieser Blüten wurde in Klassen von 0 bis 3 eingeteilt (0 = befallsfrei, 1 = beginnender Befall, 2 = fortgeschrittener Befall, 3 = starker Befall). Die Werte aller drei Blüten wurden hierbei für jedes Ährchen addiert. So konnte jedes Ährchen einen Bonitur-Wert von 0 bis 9 annehmen. Dieser Parameter wurde als Befallsstärke der Ährchen bezeichnet (Formel 2.2).

$$BS = \Sigma BS_E / n_{g\ddot{A}} \quad \textbf{Formel 2.2}$$

BS = Befallsstärke der Ährchen [Skala von 0 bis 9]

ΣBS_E = Summe der Befallsstärken aller Ährchen dieser Ähre [Skala von 0 bis $9 \cdot n$]

$n_{g\ddot{A}}$ = Gesamtzahl der Ährchen dieser Ähre

Aufgrund der einsetzenden Abreife konnte eine Zuverlässigkeit der Bonitur ab etwa drei bis vier Wochen nach Inokulation nur noch eingeschränkt gelten. Dies galt bis zur Reife in zunehmendem Maße und vor allem für die Befallsstärke der Ährchen (BS), so dass je nach Abreife-Stadium ab einem gewissen Termin auf die Erhebung dieses Parameters verzichtet wurde.

Die Befallshäufigkeit bzw. Befallsstärke des Gesamtbestands wurde nun durch Mittelwertbildung über alle Ähren eines Isolats ermittelt.

Ähren, die abgeknickt waren, die zum Lagern neigten oder die - scheinbar atypisch - innerhalb weniger Tage abstarben (gelb-grünlich, leicht feucht), wurden aus der Bonitur genommen, um den gemeinsamen Mittelwert nicht zu verfälschen.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Fläche unter der Befallskurve, die aufgrund der individuellen Bonitur der Ähren für jede Ähre ermittelt werden konnte (Formel 2.3):

$$F(t_n) = \sum_{k=0}^{n-1} \frac{1}{2} \cdot (BH(t_{k+1}) - BH(t_k)) \cdot (t_{k+1} - t_k) + BH(t_k) \cdot (t_{k+1} - t_k) \quad \text{Formel 2.3}$$

t_k = Boniturzeitpunkt in dpi (Tage nach der Inokulation)

$F(t_n)$ = Fläche unter der Befallskurve zum Zeitpunkt t

$BH(t_k)$ = Befallshäufigkeit der Ährchen dieser Ähre zum Zeitpunkt t_k [%]

Die Probenahme für die Toxinanalysen erfolgte in der Regel wöchentlich, zu Beginn der Inokulation häufiger. In den meisten Versuchen wurden pro Isolat drei Ähren entnommen, wobei jede Ähre eine einzelne Probe darstellte (pro Isolat und Probentermin also drei Wiederholungen). Eine höhere Anzahl von Wiederholungen war aufgrund des begrenzten Ährenmaterials nicht möglich.

Diese Ähren wurden aufgrund der geringen Zahl von Wiederholungen nicht zufällig ausgewählt. Es wurden solche Ähren gewählt, deren Befallshäufigkeit (oder Befallsstärke an einigen Probentagen) der für dieses Isolat durchschnittlichen Befallshäufigkeit am besten entsprach. Traten solche Ähren im Bestand nicht oder nicht mehr auf, so wurde dafür Sorge getragen, dass wenigstens der Mittelwert der drei gewählten Ähren der Befallshäufigkeit des Bestandes möglichst nahe kam.

Auch an den nicht inokulierten Kontroll-Ähren traten ab etwa zwei Wochen (selten schon ab einer Woche) nach Inokulation die ersten Symptome auf, was auf eine Sekundär-Infektion ausgehend von den anderen inokulierten Ähren zurückgeführt wurde.

Spätestens neun Wochen nach der Inokulation wurde der Versuch mit der letzten Bonitur und Probennahme beendet. Alle nun noch verbliebenen bonitierten Ähren wurden abgeschnitten und bei einem der Versuche anhand dieser Ähren Ertragsparameter erhoben (Korngrößenverteilung).

Zu diesem Zeitpunkt war das Ährenmaterial durch die Probennahme in allen Versuchen nahezu oder vollständig erschöpft.

2.7.2 Spezielle Vorgehensweise der Einzel-Versuche der Ähren-Inokulation

Diese Experimente wiesen neben diesen grundlegenden Gemeinsamkeiten auch viele individuelle Züge auf, so dass diese Versuche im folgenden auch einzeln detailliert charakterisiert werden sollen (siehe auch Anhang A.10).

2.7.2.1 Erster Versuch

Bonitur und Probennahme: Es erfolgten insgesamt 10 Probenahmen (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 dpi), wobei jeweils drei Ähren pro Isolat und eine Kontrollähre genommen wurden. Eine Probe bestand aus einer Einzelähre.

2.7.2.2 Zweiter Versuch

Bonitur und Probennahme: Da in diesem Versuch durch das atypische Absterben sehr viele Ähren früh aus der Bonitur genommen werden mussten, konnten mangels beprobbarer Ähren nur bis 42 dpi Proben genommen werden. Es erfolgten insgesamt sieben Probennahmen (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 dpi), wobei jeweils drei Ähren pro Isolat und eine Kontrollähre genommen wurden. Eine Probe bestand auch hier aus einer Einzelähre.

2.7.2.3 Dritter Versuch

Inokulation: Die Isolate 35 und 36 wurden gemeinsam in einem Wuchsschrank getestet, sowie die Isolate 34 und 37 in einem weiteren Wuchsschrank.

Da zwischen dem Auszählen der Sporen und der Inokulation etwa sieben Stunden vergingen, ist ein schon beginnendes Keimen der Sporen (vor allem für Isolat 36, das etwas länger bearbeitet wurde) nicht auszuschließen. Ein Test zeigte aber, dass jedenfalls innerhalb von 25 Stunden auf SNA bei 20 °C für alle Isolate über 90 % der Sporen gekeimt waren (Tab. 2.7).

Bonitur und Probennahme: Es erfolgten insgesamt 11 Probennahmen (3, 6, 10, 14, 21, 28, 35, 43, 49, 56, 63 dpi), wobei jeweils drei Ähren pro Isolat und eine Kontrollähre genommen wurden. An Terminen, zu denen die Befallsstärke bonitiert wurde, erfolgte die Auswahl nach der Befallsstärke, ansonsten wie gewohnt nach der Befallshäufigkeit. Eine Probe bestand aus einer Einzelähre.

Tabelle 2.7: Keimungsraten der Sporen in den Inokulationssuspensionen der vier Isolate nach 25 Stunden (bei 20 °C ± Standardabweichung) in Prozent.

	34	35	36	37
%	95,0 ± 3,7	97,3 ± 1,5	94,0 ± 5,3	97,5 ± 3,4

In diesem Versuch wurden die Proben des letzten Probentermins (63 dpi) gesondert bearbeitet. Alle noch vorhandenen Ähren (neun bis 13 pro Isolat, 17 Kontroll-Ähren) wurden nach der Gefriertrocknung in die drei Fraktionen Spindel, Spelzen, Körner (inklusive Kornanlagen) aufgeteilt. Die Körner-Fraktion wurde noch weiteren ertragsbezogenen Auswertungen unterzogen.

Die Spindeln und Spelzen von jeweils drei bis fünf verschiedenen Ähren eines Isolats wurden nun zu einer Mischprobe vereinigt. Die Auswahl der zu mischenden Einzelproben erfolgte so, dass der Mittelwert der Befallshäufigkeiten der Ausgangsähren bestmöglich der mittleren Befallshäufigkeit des Gesamtbestandes dieses Isolats entsprach. Bei mehreren Kombinationsmöglichkeiten wurde die gewählt, die die gleichmäßigste Trockenmasse-Verteilung auf die Mischproben ergab. Diese Auswahl wurde für alle drei Fraktionen (Spindel, Spelzen und Körner) in gleicher Weise durchgeführt, so dass Spindel, Spelzen und Körner derselben Ähren miteinander vereinigt wurden. Auch die Körner wurden nach der Ertragsauswertung und erneuter Gefriertrocknung in entsprechender Weise vereinigt.

Aus den 17 Kontrollähren wurde nur eine Probe (jeweils Spindel, Spelzen, Körner) aus drei Ähren zusammengestellt.

Die so entstandenen drei Chargen (Spindel, Spelzen, Korn) von 13 Proben für 63 dpi wurden wie unter 2.8 beschrieben zur Toxin-Analyse weiter aufgearbeitet.

Der Toxingehalt der Gesamtähren 63 dpi (homolog zu den anderen Proben tagen) wurde aus den drei Einzelwerten für Spindel, Spelzen und Körnern rechnerisch ermittelt unter Berücksichtigung des Trockenmasse-Anteils der einzelnen Fraktionen an der Gesamt-Trockenmasse der Ähren.

Hierbei ist zu erwähnen, dass die Körner-Proben in der Extraktion relativ stark verklumpten und eventuell ein geringerer Extraktionserfolg zu erwarten sein könnte.

Auswertung der Körner-Fraktion: Der erste erhobene Parameter war der Anteil der ausgebildeten Körner. Hierzu wurde die Körnerfraktion einer Ähre visuell in entwickelte Körner und Kornanlagen eingeteilt. Die Anzahl wurde für jede einzelne Ähre getrennt erfasst und hieraus für jedes der Isolate und die Kontrolle der Mittelwert errechnet. Die Kornzahl pro Ähre (KÄ) wurde als Summe der ausgebildeten und der nicht ausgebildeten Körner definiert.

Der Parameter Kornmasse pro Ähre (KmÄ) ergab sich als die Trockenmasse (nach 48 stündiger Gefriertrocknung) aller Körner (ausgebildet und nicht ausgebildet) einer Ähre.

Auch die Tausendkornmasse (TKM) wurde für jede Ähre einzeln bestimmt, indem die Kornmasse pro Ähre bei bekannter Kornzahl pro Ähre erhoben und diese auf 1000 Körner extrapoliert wurde.

Um den Befallsgrad der Körner einer Ähre zu erfassen, wurden die Gesamt-Körnerfraktion jeder Ähre anschließend ebenfalls visuell in gesunde Körner, leicht befallene Körner (eingedellt) und stark befallene Körner (weißlich oder mit Myzel) eingeteilt.

Abschließend wurde die Korngrößenverteilung der Körner der einzelnen Ähren bestimmt. Hierzu wurde die Gesamt-Körnerfraktion jeder Ähre einzeln für maximal 15 Sekunden in einem Sieb-Turm von Hand gesiebt, die einzelnen Größen-Fractionen ausgezählt und anzahlmäßig festgehalten (Analysensiebe für Getreide ISO 5223; Langlochung: 1,8 mm, 2,0 mm, 2,2 mm, 2,5 mm, 2,8 mm x 20 mm).

2.7.2.4 Vierter Versuch

In diesem Versuch wurden zwei verschiedene SW-Sorten getestet, und zwar die Sorten Picolo (siehe Versuche 1-3) und Frontana. Inokuliert wurde mit dem *Fusarium graminearum*-Isolat 35 (L10eWP).

Anzucht: Da die Sorte Frontana die Vollblüte etwas schneller erreichte als die Sorte Picolo, wurde die Sorte Frontana erst fünf Tage später ausgesät. In der 13. Woche mussten die Pflanzen nach gemeinsamer bisheriger Anzucht nach Sorten getrennt auf die Wuchsschränke verteilt werden, da die Halme der Frontana-Pflanzen wesentlich länger waren und die Picolo-Pflanzen beeinträchtigten.

Inokulation: Begonnen wurde bei der Inokulation mit den Kontrollen (je Sorte gut 10 Ähren). Die beiden Sorten Picolo und Frontana wurden im folgenden alternierend inokuliert.

Bonitur und Probennahme: Nach der ersten Woche wurde nur noch einmal pro Woche bonitiert. Es erfolgten insgesamt drei Probenahmen (7, 21, 63 dpi), wobei jeweils vier Proben pro Sorte und eine Kontrollähren-Probe genommen wurden. Eine Probe bestand diesmal aus zwei Einzelähren, bei 63 dpi sogar aus drei Einzelähren.

Auffällig war, dass bei der Sorte Frontana eher nur einzelne Ährchen befallen wurden und der Befall dann lange Zeit lokal begrenzt blieb.

Eine Bonitur bei der Sorte Frontana war generell schwieriger, da mit Picolo nicht vergleichbare Verbräunungseffekte auftraten. So erschienen sehr früh am Rande der Spelzen minimale Verbräunungen, die aber insgesamt nicht als Symptom gewertet wurden. Auch in späteren Infektionsstadien waren die Ähren von Frontana insgesamt stärker pigmentiert (35 dpi). Als Maßstab für eine Entscheidung konnte hier oft nur der Vergleich mit gesunden, abgereiften Ähren dienen.

2.8 Aufarbeitung des Probenmaterials für die Mykotoxin-Analysen

Sowohl die Ährenproben der Ähren-Inokulationen als auch die Reisproben der *in vitro*-Versuche wurden in ähnlicher Weise aufgearbeitet. Einer Trocknung und Zerkleinerung des Probenmaterials folgte die Extraktion, ein Aufreinigungsschritt und das Einengen der aufgereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer (verändert nach ALTPETER UND POSSELT 1994, LAUBER 1999).

2.8.1 Probenvorbereitung

Die Ähren wurden zum Termin der Probennahme direkt unter dem untersten Ährchen abgeschnitten. In der Regel wurde jede einzelne Ähre als eine Probe behandelt und separat bearbeitet. Anschließend wurde die Frischmasse bestimmt (Waage Sartorius 1207 MP2) und die Ähren bis zur Gefriertrocknung eingefroren (-20 °C). Die Gefriertrocknung der Ähren erfolgte für 48 Stunden (Christ Gamma 1-20 oder Christ Beta A) in offenen 50 ml Falcon-Röhrchen. Diese Zeit erschien ausreichend, da in einem Vorversuch nachgewiesen werden konnte, dass die Ährenmasse bei einer Trocknung für weitere 24 Stunden je nach Nekrotisierungsgrad nur noch um 0,7 bis 2,6 % der Frischmasse abnahm. Anschließend wurde die Trockenmasse bestimmt, die Proben gemahlen (Labormühle IKA A 10, 30 Sekunden bei voller Drehzahl (20000 rpm \cong 12500 x g)) und je nach vorhandener Trockenmasse 0,2 bis 0,8 g

pulverisierte Probe in 15 ml-Falcon-Röhrchen eingewogen. Da jede der Proben eines Proben-tags dieselbe Einwaage aufweisen sollte, orientierte sich die Einwaage an der kleinsten Probe. Bei Proben, die aus mehreren Ähren bestanden, wurden diese gemeinsam gemahlen. Bis zur Extraktion wurden die gemahlenen Proben bei -20 °C gelagert.

Die in 50 ml Falcon-Röhrchen inkubierten Reisproben wurden bei der Probenahme geöffnet, eingefroren (-20 °C) und dann direkt in den Röhrchen für 48 Stunden gefriergetrocknet (Christ Gamma 1-20). Anschließend wurden die Röhrchen wieder verschlossen und die Proben bis zur Extraktion im Exsikkator gelagert.

2.8.2 Extraktion

Die Proben wurden dreimal nacheinander in Methanol/Wasser (10/90) extrahiert und der vereinigte Extrakt aufgereinigt. Da bis zu 13 Proben an einem Proben-tag bearbeitet wurden, mussten die Proben in zwei Staffeln eingeteilt werden, die zeitlich versetzt bearbeitet wurden.

Tabelle 2.8: Extraktionsvolumina (Methanol/Wasser 10/90) in Abhängigkeit von Probenmaterial, Versuch und Einwaage. * entspricht 40 % Wasseranteil in den Proben.

Proben:			ml Extraktionsmittel						
Bezug	Versuch-Nr.	Einwaage in g	1. Extraktion			2. Ext.	3. Ext.	Restwasser in der	Gesamt-volumen
			H ₂ O	MeOH	Σ			Probe	
Ähre:	3,4	≤ 0,2	14,4	1,6	16	12	8	0	36
ml/g TM	3,4	0,2-0,8	10,8	1,2	12	9	6	0	27
	1,2	≤ 0,5	10,8	1,2	12	9	6	0	27
	1,2	0,5-1,0	7,2	0,8	8	6	4	0	18
Reis:	Verlauf	10	27	3	30	15	15	6,67*	66,7
ml/10 g TM	Screening	10	31,5	3,5	35	20	15	0	70

Die Konsistenz der Proben während der Extraktion war nicht immer einheitlich. Reifere Ähren-Proben (hoher mehliges Körner-Anteil) und vereinzelte Reis-Proben waren überdurchschnittlich viskos.

2.8.2.1 Ähren-Proben

Eine halbe Stunde vor der ersten Extraktion wurde den Ähren-Proben (in 15 ml Falcon-Röhrchen) der Wasseranteil der ersten Extraktion zugegeben und das Probenmaterial aufgelockert (Tab. 2.8).

Nach 30 Min. Quellung wurde der Methanol-Anteil hinzupipettiert und die erste Extraktion auf dem Überkopf-Schüttler (Heidolph Reax 2) gestartet (30 Min., Stufe 3 oder 4). Nun wurden die Proben zentrifugiert (20 °C, 2 Min., 4300 x g) und die Überstände in bereitstehende Zentrifugenröhrchen pipettiert (Nalgene Oak Ridge, 30 ml). Die zweite und dritte Extraktion erfolgten in derselben Weise. Das zweite und dritte Extraktionsvolumen wurden nicht mehr getrennt nach Wasser und Methanol zugegeben, sondern komplett. Zwischen den Extraktionsschritten wurde das durch die Zentrifugation verdichtete Probenmaterial auf einem Rüttler (IKA MS 1 minishaker) und bei Bedarf mit einem Spatel aufgelockert.

2.8.2.2 Reis-Proben

Bei den Reisproben lagen in allen 50 ml Falcon-Röhrchen 10 g Trockenmasse vor, so dass auch das Extraktionsvolumen an allen Proben Tagen eines Versuchs konstant war. Da die Reis-Proben durch die Fermentation und die Gefriertrocknung sehr verfestigt waren, wurden die Proben einer 60 minütigen Quellung unterzogen. Hierzu wurde den Proben 25 ml Wasser zugegeben (Vollpipette) und der Myzelkuchen grob mit einem Spatel aufgelockert. Nach der Quellung wurden weitere 3,25 ml Wasser auf die Probe gegeben. Anschließend wurden die Proben mit einem Mixer (Sorvall Omni-Mixer 17220; Messer mit 20 mm Durchmesser) für die Extraktion noch feiner zerkleinert. Die Körnung blieb jedoch noch deutlich gröber als bei den Ährenproben. Das Messer wurde dann mit 3,25 ml HPLC-Wasser gespült (Endvolumen des Wassers 31,5 ml).

Nun wurde der Methanol-Anteil des ersten Extraktionsvolumens zugegeben und die erste Extraktion auf dem Überkopf-Schüttler (Heidolph Reax 2) gestartet (30 Min., Stufe 3). Dann wurden die Proben zentrifugiert (20 °C, 3 Min., 4300 x g) und die Überstände in bereitste-

hende Zentrifugenröhrchen pipettiert (Nalgene Oak Ridge, 85 ml). Die zweite und dritte Extraktion erfolgten in derselben Weise. Das zweite und dritte Extraktionsvolumen wurden nicht mehr getrennt nach Wasser und Methanol zugegeben, sondern komplett. Zwischen den Extraktionsschritten wurde das durch die Zentrifugation verdichtete Probenmaterial auf einem Rüttler (IKA MS 1 minishaker) und bei Bedarf mit einem Spatel aufgelockert.

2.8.3 Aufreinigung der Extrakte der Ähren- und Reis-Proben

Die vereinigten Extrakte aus den drei Extraktionen wurden nun einer abschließenden Zentrifugation unterzogen (20 °C, 6 Min., Ähren-Proben: 14900 x g, Reis-Proben: 15600 x g), da bei den Pipettierschritten zwischen den Extraktionen leichte Verunreinigungen mit Probenmaterial nicht zu vermeiden waren. Nun wurden 10 ml des leicht trüben Überstandes in 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert.

Die Aufreinigung erfolgte an Extrelut NT-3 Fertigsäulen (Merck, Darmstadt; siehe Anhang A.4). Die Säulen wurden senkrecht an einem Gestell montiert und mit Auslaufkanülen versehen (Braun, Sterican 0,60 x 30 mm). Das Verfahren folgt dem Prinzip einer festphasengebundenen flüssig/flüssig-Extraktion, bei der sich die wässrige Probe an die Kieselgur-Matrix der Säule anlagert. Mit dem apolaren Elutionsmittel können lipophile Substanzen aus der wässrigen Phase eluiert werden.

Die Extrakte wurden im 15 ml Sarstedt-Röhrchen kurz gemischt (Labinco 524 Press-to-Mix) und dann 2,5 ml auf die jeweilige Säule pipettiert. Bei größerem Probenvolumen (Nennvolumen 3 ml) trat Wasser ins Eluat über, so dass diese Reduktion der Kapazität nötig war. Nach 30 Min. Verteilzeit begann die Elution (Elutionsmittel: 3 % Methanol in Ethylacetat), indem auf die Säule im zeitlichen Abstand von 5 bis 7 Min. dreimal 5 ml des Elutionsmittels aufgegeben wurden. Insgesamt wurde also mit 15 ml eluiert. Zwischen den ersten beiden Elutionsschritten fielen die Säulen, je nach Durchflussgeschwindigkeit, in der Regel trocken, zwischen den letzten beiden in der Regel nicht. Das Eluat wurde in 50 ml Spitzkolben aufgefangen.

2.8.4 Einengen am Rotationsverdampfer

Das Eluat wurde nun quantitativ an einem Rotationsverdampfer (Büchi, Rotavapor R 110) unter Vakuum eingengt. Dieser Schritt folgte im Anschluss an die Elution, aber frühestens

40 Min. nach Elutionsbeginn. Die Probe wurde für 15 Min. (Wasserbad ca. 32 °C, Rotation Stufe 3) bei einem Vakuum von minimal 30 mbar (Membranpumpe vacuubrand MZ 2C; brand Vacuum-Controller 220 EVC 1) eingengt. Der Rückstand in der Spitze des Kolbens war trocken bis leicht viskos.

2.8.5 Wiederaufnahmen der Probe und Lagerung

Der Rückstand in den Spitzkolben wurde quantitativ in insgesamt 500 µl Flüssigkeit (12,5 % Methanol in Wasser) aufgenommen. Hierbei wurden zuerst 62,5 µl Methanol auf den Rückstand pipettiert und nach leichtem Schwenken hierzu 438 µl Wasser gegeben. Nach erneutem Schwenken wurde die Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben wurden nun gemeinsam einer letzten Zentrifugation unterzogen, um etwaige Schwebstoffe zu eliminieren, da vor allem die Reisproben nicht immer klar waren. Nach der Zentrifugation (20 °C, 5 Min., 20800 x g (eppendorf centrifuge 5804 R) oder 16100 x g (Heraeus Biofuge pico)) wurden die Proben in HPLC-Gefäße (klar, 0,8 ml) pipettiert und mit den zugehörigen Bördelkappen verschlossen bei -20 °C bis zur Messung gelagert. In späteren Versuchen wurde die Lagerung durch ein zusätzliches Verschließen der Ampullen mit doppeltem Laborfilm (Parafilm, American National Can, USA) und bei -70 °C optimiert. Aber auch diese Zentrifugation konnte die wenigsten nach dem Wiederaufnehmen noch trüben Proben völlig klären.

Genauere Informationen zum zeitlichen Ablauf der Bearbeitung der einzelnen Reis- und Ährenproben und eventuellen Abweichungen finden sich im Anhang (A.8 und A.10).

2.9 Analytik der Mykotoxine

Grundsätzlich erfolgte die Analytik der Mykotoxine mittels reversed-phase HPLC an einer C-18 Säule mit einem Wasser/Methanol-Gradienten und Detektion im niedrigen UV-Bereich. ZON wurde zum Teil auch fluorometrisch erfasst. Es wurden ausschließlich Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet (Merck, Roth).

2.9.1 Die Komponenten der Messanlage

Die HPLC-Anlage setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Säulen:
- Merck LiChroCart 250 mm x 4 mm (Art. Nr. 150833)
LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (Octadecylsilan)
mit Vorsäule (s.o., aber 4 mm x 4 mm) (Art. Nr. 150957)
 - Bischoff MC (250 mm x 4,6 mm) (Part. Nr. 25461725)
Waters Spherisorb ODS 2 (5 µm) (Octadecylsilan)
mit Vorsäule (s.o., aber 10 mm x 4 mm)
- Detektoren:
- spectroMonitor 5000 Photo Diode Array Detector (UV),
LDC Analytical
 - FL 3000 Spectra System (Variabler Fluoreszenz-Detektor),
Thermo-Separation-Products
- Pumpen:
- constaMetric 3500 Series (Programmierbare Pumpe),
Thermo-Separation-Products
 - constaMetric 3200 Series (Zweite Pumpe), Thermo-Separation
Products
- Integratoren:
- CI-10 The Integrator (Kanal A), LDC/Milton Roy
 - CI 10 B The Integrator (Kanal B), Milton Roy
- Ausgabegeräte:
- Sekonic Plotter S-201GT (Thermodrucker) (Kanal A),
Kontron Instruments (Plotter 800)
 - Sekonic Plotter S-201GT (Thermodrucker) (Kanal B),
LDC/Milton Roy
 - Canon BJC-620 (Kanal A und B bei Nutzung mit LCtalk)
 - Servogor 210, Metrawatt (als Druck-Monitor)
- Computer:
- Personal Computer, IBM-kompatibel
Pentium-MMx 166 MHz Prozessor, 64 MB RAM,
Betriebssystem MS Windows 95
- Software:
- LCtalk, Version 2.02, LDC-Analytical

- Vakuum-Entgaser: - SCM 1000 Vacuum Membrane Degasser, Thermo-Separation-Products
- Mischer: dyn./stat. Mixer, Part. Nr. 250.450, SunChrom GmbH
- Säulen-Ofen: column thermostat Modell BFO-04 1S
- Aufgabeventil: - Rheodyne 7125; außerdem zwei 6fach Verteiler Rheodyne 7010
- Probenschleife: - 20 µl (bei 40 µl manueller Injektion)
- Mikroliter-Spritze: - Microliter Syringe 705 NR (50 µl), Hamilton
- Genauere Spezifikationen zu den einzelnen Geräte entnehme man dem Anhang (A.5).

2.9.2 Aufbau der HPLC-Anlage

Der prinzipielle Aufbau der Messanlage ist Abb. 2.1 zu entnehmen. Die Lösungsmittel wurden durch den Vakuum-Entgaser gepumpt und im Mischer im gewünschten Verhältnis vereinigt. Des Weiteren floss die mobile Phase durch das Aufgabeventil, über die Säule und durch die Detektoren.

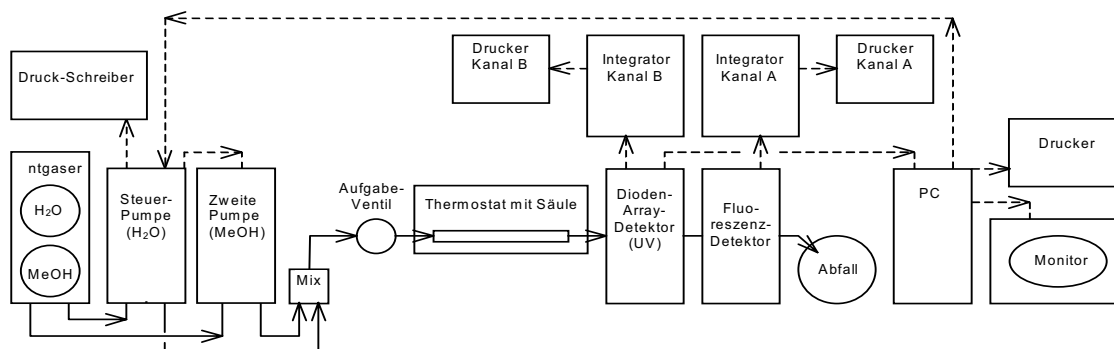


Abbildung 2.1: Vereinfachte schematische Darstellung der HPLC-Anlage. (—) Weg des Laufmittels; (- - -) Mess- oder Steuerungssignal.

Der Fluoreszenz-Detektor war nur leihweise verfügbar und wurde für diese Zeit in Reihe in die Messanlage integriert, und zwar direkt hinter den DAD.

Das Auswertsystem LCtalk mit computergestützter Integration und damit verbunden die zentrale Anlagensteuerung standen erst ab August 2001 zur Verfügung. Bis dahin erfolgte die Auswertung manuell über die Schreiber-Protokolle der beiden Integratoren, die an zwei ver-

schiedene Kanäle (Kanal A, Kanal B) des DAD angeschlossen waren (entweder verschiedene Wellenlängen oder Messbereiche). Der Start der Anlage erfolgte durch gleichzeitiges Starten der programmgebenden Pumpe und der Integratoren. Die Integratoren dienten, als die zentrale Anlagensteuerung zur Verfügung stand, nur noch zu Kontrollzwecken oder zur Erfassung der Signale des Fluoreszenz-Detektors (Kanal A, Abb. 2.1).

2.9.3 Parameter der zu analysierenden Mykotoxine

Die analytisch erfassten Mykotoxine sind DON, ADON, NIV, ANIV und ZON, die für *Fusarium graminearum* als die bedeutendsten angesehen werden können. 3ADON und 15ADON konnten nicht getrennt werden. Die Messergebnisse für ADON stellen also die Summe aus 3ADON und möglicherweise auch vorhandenem 15ADON dar. Als Standard wurde 3ADON verwendet.

Die Trichothecene vom B-Typ verfügen über ein Absorptionsmaximum im niedrigen UV-Bereich, zeigen aber keine Fluoreszenz. ZON hingegen hat mehrere Absorptionsmaxima im UV-Bereich und fluoresziert (siehe Tab. 2.9).

Tabelle 2.9: Parameter der zu analysierenden Mykotoxine (nach COLE UND COX 1981).

	g/Mol	λ_{\max}	Lösungsmittel	$\varepsilon_{\text{mol}} (\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1})$
DON	296	218	Ethanol	4500
3ADON	338	219	Ethanol	5900
NIV	312	218	Methanol	7500
ANIV	354	220	Methanol	6500
ZON	318	236	Methanol	29700
		274		13909
		316		6020

2.9.4 Verwendete HPLC-Methoden

Für beide Matrices wurden prinzipiell ähnliche Methoden (Wasser/Methanol-Gradient) und Säulenmaterialien (C₁₈-Säule) verwendet (Tab. 2.10, 2.11), die sich jedoch im Detail voneinander unterscheiden und nach umfangreichen Vorarbeiten in der hier vorliegenden Form verwendet wurden. Die Gemeinsamkeiten bestehen in einer C₁₈-Säule und einem Wasser/Methanol-Gradienten.

Tabelle 2.10: Gradientenverlauf und typische Geräteparameter der Methode M1 (Ähren-Matrix). *Vor- und Nachlauf zum Spülen der Säule.

Zeit (Min.)	0	5	13	17	25	26	28	32	32,1 bis 40
% Wasser	95	80	75	60	55	0	0	0	95
% Methanol	5	20	25	40	45	100	100	100	5
Flussrate (ml/min)	1,2			1,0			1,2		
Vorgang	Trennung					Spülen			Äquilibrieren

DAD:	Kanal A	Kanal B
Wellenlänge (λ in nm)	220	220
range (DAD)	0,02-0,04	0,005-0,12
Integrator:		
minimum area	10000	10000
Abschwächungsfaktor (attenuation-value)	11	11
allgemein:		
Säulentemperatur (°C)	Umgebungstemperatur: 19-23 (an einem Messtag max. um 3 °C schwankend)	
Druck (psi) (100 % MeOH, 1,5 ml/min)*	1850	
Druck (psi) (5 % MeOH, 1,2 ml/min)	2900	

2.9.4.1 Methode für die Ähren-Matrix (M1)

Für die Ähren-Matrix wurde eine Spherisorb-Säule (Bischoff MC (250 mm x 4,6 mm, Waters Spherisorb ODS 2; 5,0 µm) verwendet. Der Wasser/Methanol-Gradient startete mit 95/5 und endete über mehrere Stufen nach 25 Min. bei 55/45, woran sich ein siebenminütiges Spülen der Säule bei höchster Elution (0/100) anschloss (Tab. 2.10).

Bis zur nächsten Probe wurde die Säule etwa für 8 Min. äquilibriert (Tab. 2.10). Diese Methode ermöglichte bei dieser Matrix eine bessere Trennung bei DON als die vorher verwendete Methode M1a, die mit der Merck-Säule arbeitete (oder die noch ältere Methode M1b, beide siehe). Da diese Methode am Anfang der Analysen verwendet wurde, wurde diese Methode ausschließlich mit der Auswertung über die Integrator-Protokolle genutzt, wobei die Integratoren für verschiedenen Messbereiche verwendet wurden. Tab. 2.10 zeigt den genauen Gradientenverlauf und typische Geräteparameter.

Mit dieser Methode M1 wurde der Ähren-Versuch 2 gemessen. Der Ähren-Versuch 1 wurde noch mit der schon erwähnten Methode M1a gemessen, Versuche 3 und 4 mit der unter 2.9.4.2 für Reis beschriebenen Methode M2. Obwohl diese Methode nicht für Ährenproben optimiert war, war sie voll geeignet und ermöglichte pro Probe eine Zeitersparnis von 5 Min..

2.9.4.2 Methode für die Reis-Matrix (M2)

Für die Reis-Matrix wurde eine LiChrospher-Säule (Merck, LiChroCart 250 mm x 4 mm, LiChrospher 100 RP-18; 5 µm) verwendet. Der Wasser/Methanol-Gradient startete mit 95/5 und endete über mehrere Stufen nach 19 Min. bei 60/40, woran sich ein achtminütiges Spülen der Säule bei höchster Elution (0/100) anschloss. Bis zur nächsten Probe wurde die Säule etwa für 7 Min. äquilibriert (Tab. 2.11). Von der 20. bis zur 27. Minute wurde der Fluoreszenz-Detektor zur Analyse von ZON für 7 Min. dazugeschaltet, um die gepulste Xenon-Lampe zu schonen. Diese Säule wurde temperiert (20 °C). Diese Methode wurde sowohl mit der Auswertung über die Integrator-Protokolle genutzt, als auch mit einer Auswertung über die computergestützte Integration ab August 2001. Die Integrator-Protokolle wurden auch weiterhin zu internen Kontrollzwecken verwendet, allerdings im Gegensatz zu 2.9.4.1 mit verschiedenen Wellenlängen. Tab. 2.11 zeigt den Gradientenverlauf und typische Geräteparameter.

Tabelle 2.11: Gradientenverlauf und typische Geräteparameter der Methode M2 (Reis-Matrix). *Vor- und Nachlauf zum Spülen der Säule.

Zeit (Min.)	0	7	12,6	13	19	21	27	28	28 bis 35
% Wasser	95	80	76,5	50	60	0	0	95	95
% Methanol	5	20	23,5	50	40	100	100	5	5
Flussrate (ml/min)	1,5								
Vorgang	Trennung					Spülen		Äquilibrieren	

	ohne Fluoreszenz-Detektor mit LCtalk (ohne LCtalk)		mit Fluoreszenz-Detektor	
DAD:	Kanal A	Kanal B	Kanal A	Kanal B
Detektor	DAD	DAD	FL 3000	DAD
Wellenlänge (λ in nm)	236 (220)	220	274/470	220
range (DAD)	0,08/0,15 (0,02/0,04)	0,02/0,04 (vari- abel)	10 oder 20	0,06
Integrator:				
minimum area	100, 1000 (1000, 10000)	100, 1000 (10000)	500	1000-10000
Abschwächungsfaktor (attenuation-value)	11	11	10	11
allgemein:				
Säulentemperatur (°C)	auf 20 °C temperiert			
Druck (psi) (100 % MeOH, 1,5 ml/min)*	1400-1500			
Druck (psi) (5 % MeOH, 1,5 ml/min)	2600-3000			
LCtalk:	Kanal 1	Kanal 2	Kanal 1	Kanal 2
Wellenlänge (λ in nm)	220	236	220	236

2.9.5 Herstellung und Chromatogramme der Standards

Grundsätzlich wurde mit Misch-Standards aus allen fünf Mykotoxinen gearbeitet (Abb. 2.2 und 2.3). Die Toxine wurden einzeln eingewogen (Mikrowaagen Sartorius MC 210 P und MC 5) oder bei kleineren Mengen, bei denen nur 1 mg Substanz zur Verfügung stand, wurde diese Substanz im gelieferten Glasgefäß quantitativ gelöst (nominell 1 mg).

Nach Hersteller-Angaben (Sigma) könnte hierbei ein Fehler von 10 % auftreten (wobei eher zuviel als zu wenig Substanz geliefert würde). Je Toxin wurde eine 2000 ppm ($\cong \mu\text{g/ml}$) Stammlösung in Methanol hergestellt. Je 440 μl der fünf Stammlösungen wurden vereinigt, so dass nun von jedem Toxin 400 ppm hierin vorlagen. Da in der Lösung auch nach längerem Schütteln Schwebeteilchen vorlagen, wurde die Lösung mit einem Spritzenvorsatzfilter (Sartorius SRP 15) filtriert. Das Filtrat wurde nun mit Wasser auf 12,5 % Methanol verdünnt, so dass in diesem Ausgangs-Standard 50 ppm eines jeden Toxins vorlagen. Aus diesem Standard wurden nun sequentiell alle anderen Standards pipettiert (25 ppm, 12,5 ppm, 5 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm, 0,1 ppm, 0,05 ppm, 0,01 ppm). Die Standards wurden in HPLC-Ampullen pipettiert (je etwa 700 μl) und die Bördekappen zusätzlich mit zwei Lagen Laborfilm (Parafilm) verschlossen.

Die Lagerung der Standards erfolgte bei -20 °C bzw. -70°C. Nach etwa einem Jahr wurden neue Standards angesetzt.

In Abb. 2.2 ist die chromatographische Trennung der vier Trichothecene NIV, DON, ANIV und ADON dargestellt. Die Mykotoxine eluieren in strenger Abhängigkeit von ihren Polaritätseigenschaften, wobei NIV das polarste und ADON das apolarste ist (siehe Strukturformeln in der Einleitung).

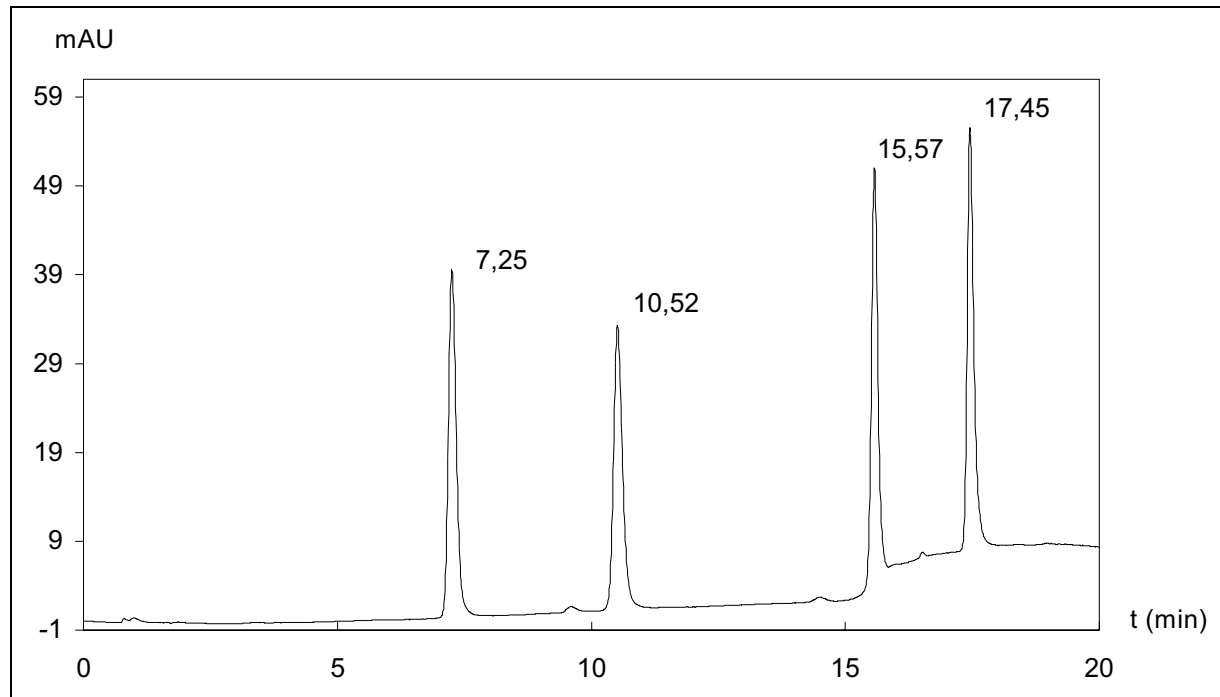


Abbildung 2.2: HPLC-Chromatogramm eines 25 ppm-Misch-Standards (Trichothecene bei 220 nm, Methode M2). NIV bei 7,25, DON bei 10,52, ANIV bei 15,57, ADON bei 17,45. Die unübliche Skalierung der Koordinate dieses und aller übrigen HPLC-Chromatogramme hat ihre Ursache in der verwendeten Software.

Über längere Zeit veränderten sich in den Standards die Verhältnisse der Peak-Höhen für die Trichothecene zueinander (Anhang A.11). Die Peaks der acetylierten Derivate (ADON und ANIV) nahmen an Größe und Fläche ab, während die von DON und NIV zunahmen (Deacetylierung als mögliche Erklärung). In den Ähren-Versuchen 3 und 4 und im Reis-Versuch 2 wurde für die Trichothecene daher mit von der LCtalk-Einheit gespeicherten Standarddaten gearbeitet.

In Abb. 2.3 ist ein Chromatogramm des ZON-Standards dargestellt. Im mittleren Bild lag ein Mischpeak aus ZON und einem undefinierten Störpeak vor. Ein Beispiel eines solchen Störpeaks zeigt die rechte Abbildung. Die Höhe dieses Peaks war variabel. Bei der Fluoreszenz-Detektion (linkes Bild) war dieser Störpeak bedeutungslos. Daher wurde die Fluoreszenz-Detektion bevorzugt.

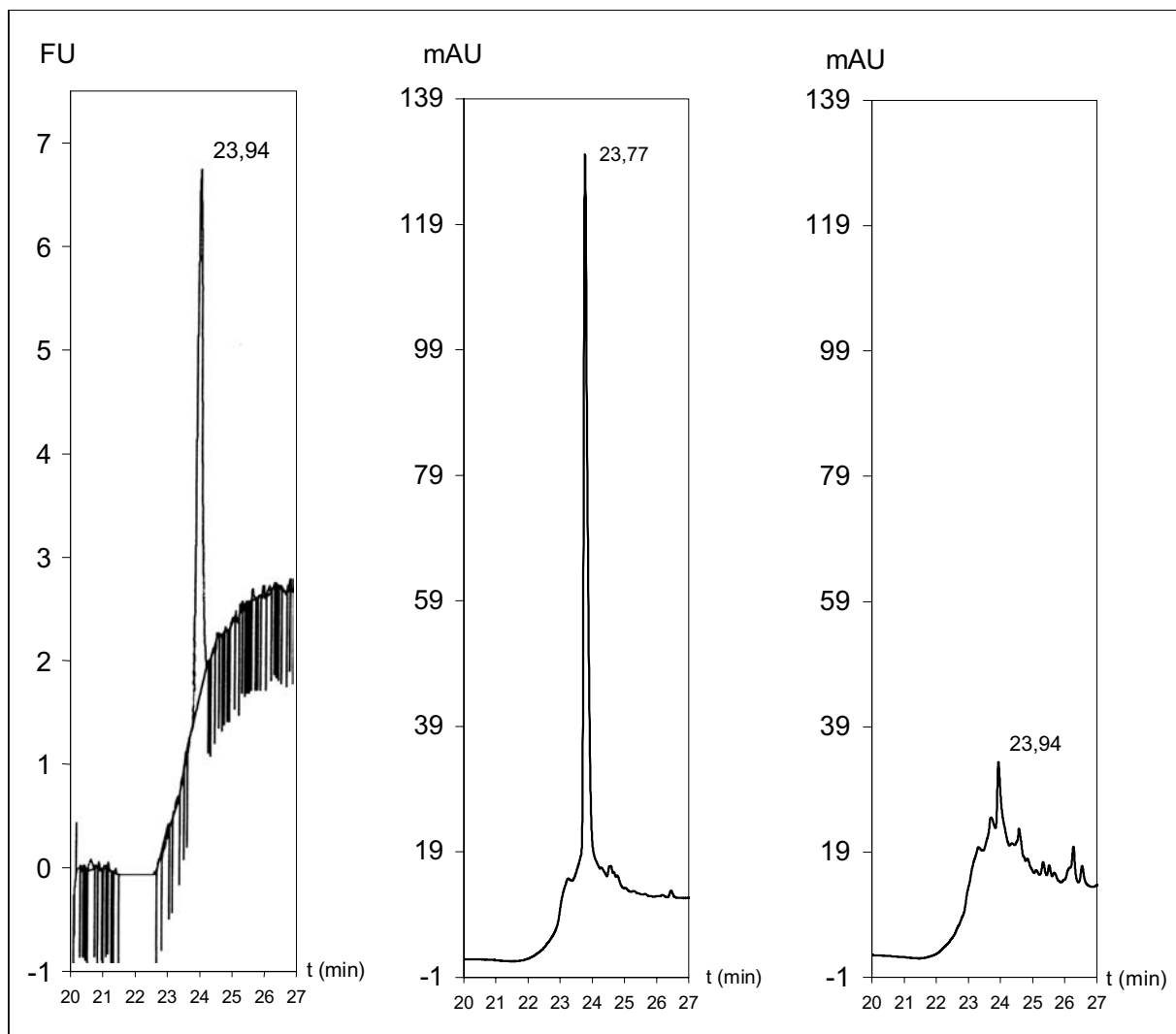


Abbildung 2.3: Ausschnitte aus HPLC-Chromatogrammen zur Messung von ZON (Methode M2). links: 25 ppm-Misch-Standard, Fluoreszenz-Detektion von ZON bei 23,94 (Anregung bei 274 nm, Emission bei 470 nm). Mitte: 25 ppm-Misch-Standard, UV-Detektion von ZON bei 23,77 (236 nm). rechts: Gradient ohne Injektion, UV-Detektion (236 nm), Störpeak bei 23,94 zu Beginn des Messtags.

Bei ZON konnte mit Hilfe des Fluoreszenzdetektors zwar die Spezifität erhöht werden (Abb. 2.3), aber dies ging zulasten der Nachweisgrenze, da die Quantenausbeute offenbar relativ gering ist. Hinzu kommt, dass der Extinktionskoeffizient für das Absorptionsmaximum bei 274 nm deutlich geringer ist als bei 236 nm (siehe Tab. 2.9). Eine Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 236 nm wurde getestet, scheiterte aber an der sehr starken Baseline-Drift in diesem Bereich, wodurch eine zuverlässige Berechnung des Peaks erschwert worden wäre. Die Messung der Kalibrierkurve von ZON zeigte deutlich, dass schon beim 5

ppm-Standard eine zuverlässige Detektion des ZON-Peaks nicht immer gelang, und der Wert deutlich zu niedrig eingeschätzt werden könnte. Daher wurde bei der ZON-Messung mit Fluoreszenz-Detektion bei allen Proben, bei denen zwar ein ZON-Peak erkennbar war, dieser aber nicht gut getrennt und der Wert geringer als 5 ppm war, im Ergebnis-Teil der Vermerk "weniger als 5 ppm" gemacht (3.3.2, Abb. 3.20).

Da die ZON-Standards von Messtag zu Messtag Schwankungen aufwiesen (steigende Tendenz), wurde zur Berechnung der ZON-Konzentration in den Proben der Standard des jeweiligen Messtags mit dem Mittelwert aller anderen Messtage korrigiert (Gewichtung 1 zu 1).

Die Ergebnisse der Kalibrierkurven (3.1.2.1) zeigten, dass im vermessenen Bereich bis 50 ppm für alle Mykotoxine von einem linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Detektorsignal ausgegangen werden konnte, wie es das LAMBERT-BEER'sche Gesetz vermuten ließ (Formel 2.4).

$$E = \epsilon_{\text{mol}} \cdot c \cdot d$$

Formel 2.4

E = Extinktion [dimensionslos]

c = Konzentration des gelösten Stoffes [Mol/l]

d = Schichtdicke [cm]

ϵ_{mol} = molarer Extinktionskoeffizient des gelösten Stoffes [$\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$]

(abhängig von Wellenlänge und Lösungsmittel)

Für die Fluoreszenzintensität gilt folgende Beziehung (Formel 2.5, verändert nach SCHWEDT 1981):

$$F = 2,3 \cdot k \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \epsilon_{\text{mol}} \cdot c \cdot d$$

Formel 2.5

F = Fluoreszenzintensität

Φ_F = Quantenausbeute [dimensionslos]

I_0 = Intensität der Anregungsstrahlung

k = gerätespezifische Konstante

Es bestand kein nennenswerter Unterschied zwischen der Zuverlässigkeit der Kalibrierkurven bei Verwendung der Höhe oder der Fläche der Peaks (Tab. 3.6). Ebenso wenig gab es Unterschiede zwischen der Zuverlässigkeit der ZON-Kalibrierkurven mit UV- oder Fluoreszenz-Detektion.

2.9.6 Integration der Rohdaten

Der DAD lieferte Rohdaten (maximal 10 Werte pro Sekunde über das gesamte Spektrum von 190 nm - 360 nm) als eine Folge von Spannungssignalen proportional zur momentanen Extinktion in der Messzelle, die durch eine charakteristische Folge von Minima und Maxima (Peaks) gekennzeichnet waren. Zur Integration dieser Daten dienten zum einen die an die analogen Ausgänge Kanal A und B angeschlossenen Integratoren, zum anderen später die LCTalk-Software der computergestützten Steuerungseinheit (typische Parameter Tab. 2.12). Einige Prinzipien dieser Berechnung sollen hier kurz erläutert werden.

Peak-Erkennung:

Drei der zur Peak-Erkennung wichtigen Parameter sind die minimale Fläche (min. area), der Schwellenwert (threshold) und die Steigungs-Empfindlichkeit (slope sensitivity).

min. area: Dies ist die minimale Fläche, die vom Beginn bis zum Ende eines Peaks zwischen Detektorsignal und Basislinie eingeschlossen werden muss. Kleinere Peaks werden nicht berücksichtigt. Die Höhe eines Peaks spielt bei diesem Parameter keine Rolle.

threshold: Solange dieser Schwellenwert vom Detektorsignal unterschritten wird, wird das Signal nicht als Peak, sondern als driftende Basislinie erkannt

slope sensitivity: Dieser Wert steht für den Steigungswert des Detektorsignals, ab dem ein Ansteigen (oder Abfallen) der Baseline als Peak-Beginn (oder -ende) interpretiert wird.

Bestimmen der Basislinie:

Die Basislinie wurde ausschließlich nach der Tal-zu-Tal-Methode (valley to valley) festgelegt, wobei die Basislinie nicht auf dem Niveau des Startwerts verbleibt, sondern die Linie der Peak-Anfänge nachzeichnet.

Höhenberechnung:

Die Höhe eines Peaks wurde durch Fällen des Lots im Maximum des Peaks auf die Basislinie bestimmt. Daher war es von großer Bedeutung, auf welche Art die Basislinie bestimmt wurde (s.o.).

Tabelle 2.12: Typische Integrationsparameter für die Integratoren und die LCtalk-Software. - nicht vorhanden.

	Integratoren CI-10	LCtalk-Software
min. area	100 bis 100.000	meist 1000
threshold	500	500
slope sensitivity	-	75

2.9.7 Auswertung der Chromatogramme

2.9.7.1 Qualitative Auswertung der Chromatogramme

Es wurden verschiedene Kriterien verwendet, um die Identität einer Substanz in der Probe mit der Standardsubstanz sicherzustellen.

Das erste und mit Abstand wichtigste Kriterium war die Retentionszeit. Hierbei wurden Abweichungen von etwa $\pm 1/10$ Minute fraglos akzeptiert, da Parameter wie Umgebungstemperatur (trotz temperierter Säule!) und Konzentration der Substanz einen leichten Einfluss auf die Retentionszeit hatten.

Ein weiteres Kriterium war der Chemotyp eines Isolats. So war in einer Probe, in der ein deutlicher DON-Peak vorlag, auch ein ADON-Peak zu erwarten (ähnliches galt für NIV und ANIV).

Auch die Form eines Peaks konnte Aufschluss darüber geben, ob es sich um einen Substanz-Peak (schmal), oder aber um einen Störpeak (breit) handelte. Besonders im Bereich von NIV, wo mehrere breite Störpeaks mit ähnlicher Retentionszeit wie NIV auftraten, wurde dieses Kriterium herangezogen.

Ebenso wurde das Peak-Muster eines Chromatogramms mit in die Auswertung einbezogen. Bei gleicher Matrix und gleicher *Fusarium*-Art lag generell ein ähnliches Peak-Muster vor. So konnte beispielsweise mit einiger Sicherheit gesagt werden, dass ANIV, wenn es in einer Probe enthalten war, als der sechste Peak vor ADON auftrat.

Ein weiteres Kriterium stellte das UV-Spektrum eines Peaks dar, das durch die Verwendung des DAD zur Verfügung stand. So konnte das Spektrum des Standards mit dem des fraglichen Peaks verglichen werden. Dieses Instrument erwies sich jedoch als wenig schlagkräftig für kleinere und daher gerade fragliche Peaks. In diesem Fall wurde das Spektrum nämlich stark von dem Lösungsmittel und evtl. auch von Nebenpeaks beeinflusst, so dass eine klare Aussage nicht möglich war. Lediglich die Absicherung deutlicher Peaks, die die anderen Kriterien ohnehin erfüllten, wäre auf diese Art möglich. Ebenso die Entlarvung falsch positiver Peaks, wie in einem Fall von Isolat 51. Dieses Isolat zeigte auf Reis *in vitro* nach 21 Tagen einen sehr hohen, deutlichen Peak bei der Retentionszeit von ANIV. Fast alle anderen Kriterien sprachen dafür, dass es sich tatsächlich um ANIV handelte. Allerdings war kein eindeutiger NIV-Peak vorhanden. Das Spektrum dieses Peaks zeigte ein deutlich anderes Bild als das vom ANIV-Standard, so dass eine Identität eindeutig ausgeschlossen werden konnte (Abb. 2.4).

In Versuchen, in denen mit bekannten Isolaten bekannten Chemotyps gearbeitet wurde (alle Ähren-Versuche und der Versuch zum Verlauf der Toxinbildung auf Reis), wurde ein Peak anhand der Retentionszeit (Standard $\pm 1/10$ Minute) als mit dem Standard identisch akzeptiert, sobald er die Höhe (oder Fläche) eines etwaigen Störpeaks in der Kontrolle überschritten hatte. Kleine Peaks vermeintlicher Toxine des anderen Chemotyps wurden ignoriert. Die anderen oben genannten Kriterien spielten hier eine nur untergeordnete Rolle.

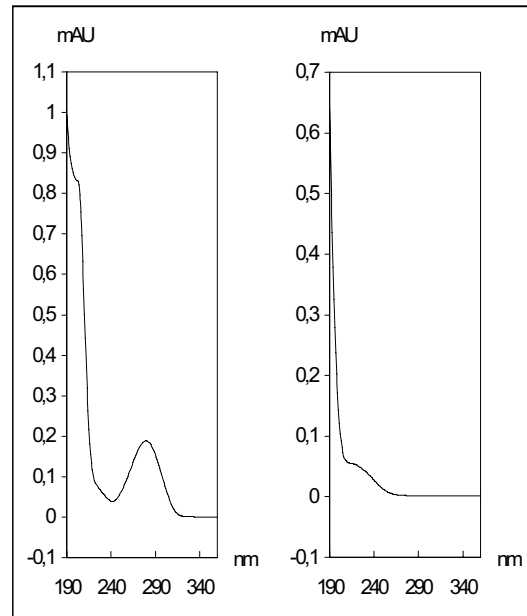


Abbildung 2.4: UV-Spektren bei einer Retentionszeit von 15,54 Min. nach chromatographischer Trennung (HPLC, Methode M2). links: von Isolat 51 fermentierte Reis-Probe. rechts: ANIV-Standard (25 ppm).

Im Screening-Versuch zur Toxinbildung vieler verschiedener, unbekannter *Fusarium*-Isolate wurden hingegen die oben genannten Kriterien bei Bedarf angewendet. Trotzdem blieben viele Peaks bei der Retentionszeit von NIV bzw. ANIV fraglich, da es sich um relativ kleine Peaks handelte, deren Spektrum nicht eindeutig war, da die Peaks trotz anderen Chemotyps auftraten oder da dieser Peak nur in einer der drei Parallelen vorhanden war (beispielsweise im Zusatz-Ansatz). Solche Peaks wurden im Ergebnisteil nicht berücksichtigt.

Im Gegensatz zur Reis-Matrix konnte in den Ähren-Versuchen nur DON sicher nachgewiesen werden, ADON wenigstens qualitativ (3.7.9). Der Grund dafür lag zum einen im Chemotyp der in den Ähren-Inokulationen verwendeten *Fusarium*-Isolate (nur DON-Chemotyp), zum anderen in einer nicht optimalen Trennung für ANIV, ADON und ZON. In Versuchen zur Wiederfindungsrate (3.1.2.3) waren die Peaks bei ADON, ANIV und ZON wenigstens qualitativ eindeutig ansprechbar. NIV war in der Ähren-Matrix generell durch einen deutlichen Störpeak maskiert (Abb. 3.8, 3.58).

2.9.7.2 Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Die hinreichend identifizierten Peaks wurden nun quantitativ ausgewertet. In einem ersten Schritt der Auswertung wurde die Konzentration in der vorliegenden Messlösung der Probe bestimmt. Generell lief diese Auswertung mit Hilfe der externen Standards bekannter Konzentration ab. Im zweiten Schritt (2.9.7.2.3) wurde die Konzentration des Toxins in der Trockenmasse der Probe (ppm; mg/kg Trockenmasse) berechnet unter Berücksichtigung aller während der Aufarbeitung aufgetretener Verdünnungsfaktoren (siehe 2.8). Für den ersten Schritt wurden unterschiedliche Methoden verwendet (2.9.7.2.1 bzw. 2.9.7.2.2):

2.9.7.2.1 Auswertung nach den Schreiberprotokollen

Bevor die computergestützte Auswertung mit der LCtalk-Software zur Verfügung stand, wurden die Schreiberprotokolle verwendet, die die von den Integratoren berechneten Daten ausgaben. Hier wurde für jeden Peak ein Wert für seine Höhe und seine Fläche ausgegeben (in gerätespezifischen relativen Einheiten). In aller Regel wurde hier die Peak-Höhe als Bezugsgröße verwendet, und die Konzentration in der Messlösung der Probe nach folgender Formel 2.6 unter Berücksichtigung eines etwaigen Störpeaks im Kontroll-Ansatz berechnet:

$$c_M = ((h_M - h_F) / h_S) \cdot c_S$$

Formel 2.6

c_M = Konzentration in der Messlösung [ppm \triangleq $\mu\text{g/ml}$]

c_S = Konzentration im Standard [ppm \triangleq $\mu\text{g/ml}$]

h_M = Höhe des Detektorsignals für die Messlösung [dimensionslos]

h_F = Höhe des Detektorsignals eines etwaigen Störpeaks im Kontroll-Ansatz
[dimensionslos]

h_S = Höhe des Detektorsignals für den Standard [dimensionslos]

Als Höhe des Standards wurde hierbei der Mittelwert aus mindestens zwei Standard-Messungen vom selben Messtag verwendet. Zur Berechnung diente das Programm Excel 97 (Microsoft). Nach diesem Verfahren wurden die Ähren-Versuche 1 und 2 und der Versuch zum Toxinbildungs-Verlauf auf Reis ausgewertet.

Außerdem wurden die ZON-Messungen im Screening-Test zur Toxinbildung auf Reis (über den Fluoreszenzdetektor) nach diesem Verfahren ausgewertet, da eine direkte Verbindung des Detektors mit dem Personal-Computer nicht möglich war. Der einzige Unterschied bestand darin, dass vom Fluoreszenz-Signal die flächenbezogenen Daten als Rechen-Grundlage herangezogen wurden, da durch den Verlauf der Basislinie in diesem Bereich eine Berechnung nach der Höhe eine größere Ungenauigkeit vermuten ließ.

2.9.7.2.2 Auswertung mit Hilfe der Software LCtalk

Hiezu wurden die Daten des DAD über eine serielle Schnittstelle direkt an den Personal-Computer gesendet. Die LCtalk-Software konnte über eine entsprechend programmierte Datei (method-file) diese Rohdaten erstens zu Peak-bezogenen Daten integrieren und zweitens bei voriger Eingabe entsprechender Parameter (Retentionszeiten und Response-Faktoren) aus der Höhe oder Fläche eines Peaks die Konzentration der entsprechenden Substanz berechnen. Der Response-Faktor einer Substanz ist für eine lineare Beziehung wie folgt festgelegt (Formel 2.7; hier bezogen auf die Fläche):

$$R_f = (c_s/F_s) \cdot V_M \quad \textbf{Formel 2.7}$$

Hieraus ergibt sich für die gesuchte Konzentration (Formel 2.8):

$$c_M = (F_M \cdot R_f) / V_M \quad \textbf{Formel 2.8}$$

R_f = Response-Faktor [ppm · µl]

c_s = Konzentration im Standard [ppm $\hat{=}$ µg/ml]

c_M = Konzentration in der Messlösung [ppm $\hat{=}$ µg/ml]

F_s = Fläche des Detektorsignals für den Standard [dimensionslos]

F_M = Fläche des Detektorsignals für die Messlösung [dimensionslos]

V_M = Volumen der injizierten Messlösung [µl]

Da die Gehalte der Trichothecen-Standards sich wie schon erwähnt (2.9.5) über längere Zeiträume änderten (vermutlich durch Deacetylierung), wurde bei den Versuchen, die mit Hilfe der Software berechnet wurden, nicht mit den am jeweiligen Messtag gemessenen Standards als Bezugsgröße gearbeitet. Vielmehr wurden die zuverlässigeren Mittelwerte mehrerer Standards verwendet, die kurze Zeit (ca. 8 Wochen) nach dem Ansetzen der Standards gemessen worden waren. In diesem Fall wurde mit der Fläche als Bezugsgröße gearbeitet, da auf zwei verschiedenen Exemplaren der gleichen Säule gearbeitet worden war und die Fläche die bessere Übertragbarkeit zeigte. Die daraus errechneten Response-Faktoren und die zugehörigen Retentionszeiten (zur Erkennung der Peaks durch die Software) wurden, wie schon die Integrationsparameter (siehe Tab. 2.12) in den entsprechenden method-file eingebunden (Tab. 2.13).

Tabelle 2.13: Kalibrierungsparameter in method-file m2calz.mth.

	DON	ADON	NIV	ANIV	ZON
Retentionszeit [Min.] (Toleranz $\pm 2\%$)	10,45	17,40	7,25	15,45	23,90
Response-Faktor [$\text{ppm} \cdot \mu\text{l} \cdot 10^{-3}$]	1,25	1,16	1,18	1,24	-

Die so von der Software ermittelten Peaks wurden nach den oben genannten Kriterien auf Identität geprüft und die Konzentrationen um etwaige Störpeaks im Kontroll-Ansatz korrigiert (Excel).

Auf diese Weise wurden die Ähren-Versuche 3 und 4 und der Screening-Test zur Toxinbildung auf Reis (außer den ZON-Messungen in diesem Versuch, siehe 2.9.7.2.1) ausgewertet.

2.9.7.2.3 Berechnung der Toxinkonzentration in den Proben unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren

Unabhängig davon, wie die Konzentration in der Messlösung berechnet wurde, wurden nun alle Daten auf dem selben Weg weiter verrechnet.

Unter Berücksichtigung der während der Aufarbeitung des Probenmaterials aufgetretenen Verdünnungs- bzw. Konzentrierungsschritte lieferte folgende Formel 2.9 (Excel) das Ergebnis für die Toxinkonzentration direkt im Probenmaterial (mg Toxin pro kg Trockenmasse).

$$c_P = ((c_M \cdot V_W) / V_{El}) \cdot V_{Ex} \quad \text{Formel 2.9}$$

c_P = Konzentration im Probenmaterial [ppm \triangleq $\mu\text{g/g}$]

c_M = Konzentration in der Messlösung [ppm \triangleq $\mu\text{g/ml}$]

V_W = Volumen, in das der Rückstand nach dem Einengen wieder aufgenommen wurde [ml]

V_{El} = Probenvolumen, das zur Aufreinigung auf die Säule aufgetragen wurde [ml]

V_{Ex} = Gesamtextraktionsvolumen pro Gramm Trockenmasse [ml/g]

In den Ähren-Inokulationen wurde dieser Wert für DON als "DON 1" bezeichnet.

2.9.7.2.4 Berechnung weiterer Größen (DON 2, DON 3)

In diesem Abschnitt soll in Kürze die Berechnung weiterer Größen zur Quantifizierung der Toxinbelastung erläutert werden, wobei jeweils andere Bezugsgrößen für den Toxingehalt verwendet wurden. Diese Größen wurden nur für den DON-Gehalt in Getreideähren berechnet.

Eine solche Größe war die **DON-Menge pro Gramm befallener Ährenmasse** (DON 2, Formel 2.10), wobei in die Berechnung nicht die Masse der Gesamtähre einging, sondern nur der Anteil der Masse, der der prozentualen Befallshäufigkeit der Ährchen der jeweiligen Ähre entsprach. Die Befallshäufigkeit der Ährchen für jede Ähre stand durch die simultane individuelle Bonitur aller Ähren uneingeschränkt zur Verfügung (siehe 2.7).

$$c_{b\bar{A}} = c_P / (BH / 100) \quad \text{Formel 2.10}$$

$c_{b\bar{A}}$ = Konzentration in der befallenen Ährenmasse [ppm \triangleq $\mu\text{g/g}$ befalleneTM] (= DON 2)

c_p = Konzentration im Probenmaterial [$\text{ppm} \triangleq \mu\text{g/gTM}$]

BH = Befallshäufigkeit der Ährchen der jeweiligen Ähre [%]

Eine weitere verwendete Größe ist die **Gesamt-DON-Menge pro Ähre** (DON 3, Formel 2.11):

$$m_{T\ddot{A}} = c_p \cdot TM_{\ddot{A}} \quad \textbf{Formel 2.11}$$

$m_{T\ddot{A}}$ = Gesamttoxinmasse pro Ähre [μg] (= DON 3)

c_p = Konzentration im Probenmaterial [$\text{ppm} \triangleq \mu\text{g/gTM}$]

$TM_{\ddot{A}}$ = Trockenmasse der jeweiligen Ähre [g]

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit MS-Office 97, SAS (Version 8.02) und SigmaStat (Version 1.01) durchgeführt.

Office 97 diente hierbei lediglich zur Berechnung von Regressionen, des Bestimmtheitsmaßes oder beschreibender Parameter wie Mittelwert und Standardabweichung (σ_{n-1}). Gelegentlich wurde Office 97 auch zur Berechnung der Korrelation nach Pearson genutzt.

Mit SAS wurden Varianzanalysen (GLM-Procedure), multiple Vergleiche (Tukey-Test) und der t-Test durchgeführt.

SigmaStat diente zur Berechnung der Korrelationen nach Pearson.

Wo nicht anders erwähnt, stellen Ergebnisse grundsätzlich die Mittelwerte aus n Wiederholungen \pm Standardabweichung dar. Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$). Bei der Verwendung anderer Signifikanz-Niveaus wird dies ausdrücklich erwähnt.

3. Ergebnisse

3.1 Methodische Ergebnisse

In diesem Kapitel werden diejenigen methodischen Ergebnisse vorgestellt, die allgemeiner Natur sind und daher keinem der nachfolgenden Kapitel zugeordnet werden können.

3.1.1 Ergebnisse zur Probenbearbeitung für die Mykotoxinanalysen

3.1.1.1 Anzahl der Extraktionsschritte

In einem Vorversuch wurde geklärt, wieviele aufeinander folgende Extraktionsschritte für eine möglichst verlustfreie Aufarbeitung des Probenmaterials notwendig waren. Der größte Anteil der Deoxynivalenol-Menge (DON) wurde im ersten (77,8 %) und zweiten (16,5 %) Schritt extrahiert. Im dritten Schritt wurden 4,5 % des Toxins extrahiert und im vierten 1,2 % (Tab. 3.1). In den Routinearbeiten wurden drei Extraktionsschritte durchgeführt (insgesamt 98,8 %). Auf die vierte Extraktion wurde verzichtet.

Tabelle 3.1: DON-Menge in vier sequentiellen Extraktionsschritten (jeweils 8 ml/g TM) bei Extraktion einer stark befallenen Weizen-Ähre (Picolo, BH = 68 %). Die Summe aller vier Extraktionsschritte wurde = 100 % gesetzt. ES = Extraktionsschritt.

	1. ES	2. ES	3. ES	4. ES	Summe
absolut (ppm)	154,7	32,8	8,9	2,5	198,8
prozentual	77,8	16,5	4,5	1,2	100

3.1.1.2 Anzahl der Elutionsschritte

Wie schon für die Extraktion sollte auch für die Elution getestet werden, wie effektiv die einzelnen nacheinander an derselben Säule ausgeführten Elutionsschritte waren (Tab. 3.2). Hierzu wurde ein auf einer Säule gebundener Reis-Extrakt fünfmal nacheinander mit je 5 ml Elutionsmittel eluiert. In diesem Versuch wurde auf die Extrelut NT 3-Säule 3 ml Probe

aufgetragen im Gegensatz zu den später routinemäßig verwendeten 2,5 ml. Die ersten drei Eluate wurden vereinigt, ebenso die letzten beiden Eluate (4 und 5).

Tabelle 3.2: Effektivität der Elutionsschritte 1 bis 3 und 4 bis 5 (DON). Die Summe der DON-Gehalte beider Eluate wurde = 100 % gesetzt.

	1. bis 3. Elution	4. bis 5. Elution
absolut (ppm)	8,93	1,24
prozentual	87,8	12,2

In den ersten drei Elutionsschritten wurden 87,8 % des gesamten Toxins extrahiert. In den Routine-Analysen wurde auf eine vierte und fünfte Elution verzichtet.

3.1.1.3 Reproduzierbarkeit der Elution

Um die Reproduzierbarkeit der Elution zu testen, wurde ein wässriger Extrakt (Gemisch aus den Restextrakten des 2. Ährenversuchs 28 dpi) in siebenfacher Wiederholung auf sieben verschiedene Extrelut NT 3-Fertigsäulen aufgetragen und die Eluate dann wie beschrieben getrennt weiter bearbeitet.

Die Ergebnisse in Abb. 3.1 zeigen, dass vereinzelt relativ große Abweichungen vom Mittelwert auftraten (max. -15,5 %), die meisten Messwerte aber relativ eng beieinander lagen (Mittelwert der absoluten Abweichung 7 %). Eine mögliche Ursache für diese Schwankungen könnte in unterschiedlicher Packung der Säulen und damit verbundener unterschiedlicher Säulen-Laufzeit liegen.

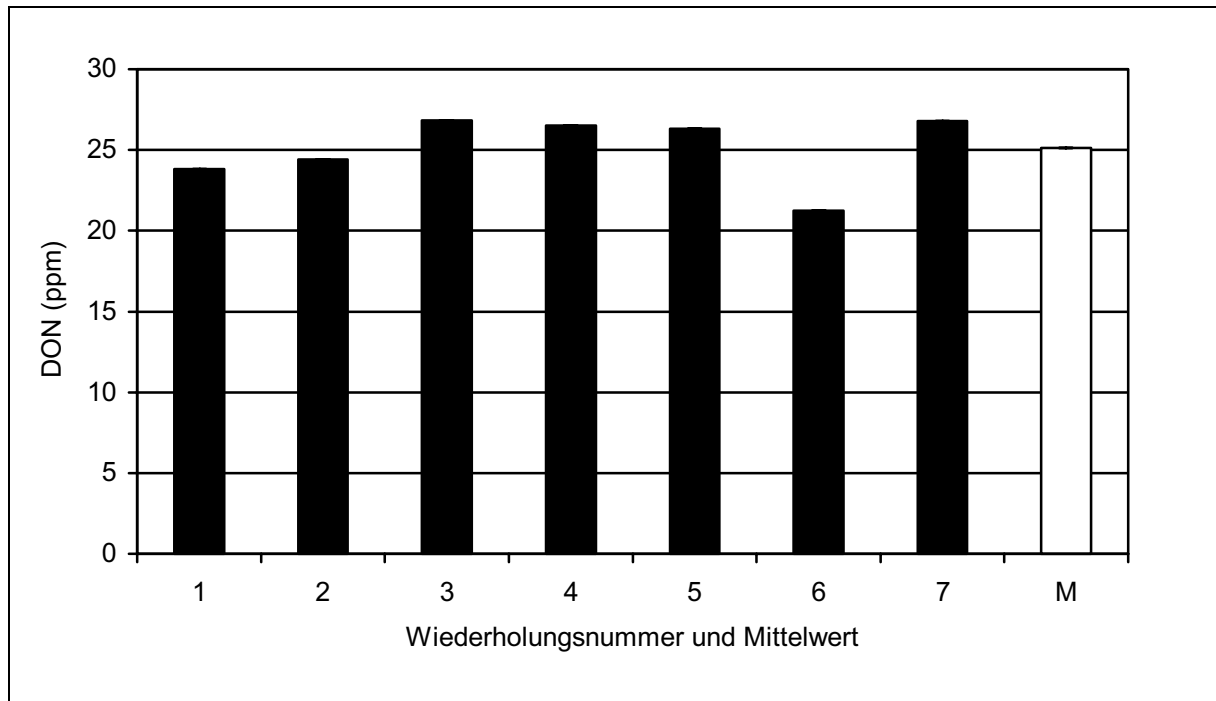


Abbildung 3.1: Reproduzierbarkeit der Elution an Extrelut NT 3-Fertigsäulen am Beispiel einer siebenfach wiederholten Elution eines Ährenextraktes (DON-Werte, nach der Höhe mit externem Standard über Integrator-Protokoll berechnet).

3.1.1.4 Reproduzierbarkeit der Bearbeitungsschritte nach der Elution

Nach der Elution wurden die Eluate am Rotationsverdampfer eingeeengt, in Lösungsmittel wiederaufgenommen und dann an der HPLC analysiert. Die Reproduzierbarkeit dieser Schritte wurde gemeinsam getestet, indem ein Eluat (Gemisch aus den Rest-Eluaten des 2. Ährenversuchs 35 dpi) nach siebenfacher Aliquotierung getrennt weiter bearbeitet wurde (Abb. 3.2).

Ähnlich wie schon bei der Elution (Abb.3.1) lagen die meisten Messwerte relativ nahe am gemeinsamen Mittelwert. Aber hier trat ein stärker abweichender Messwert auf (Abb. 3.2, WDH 5).

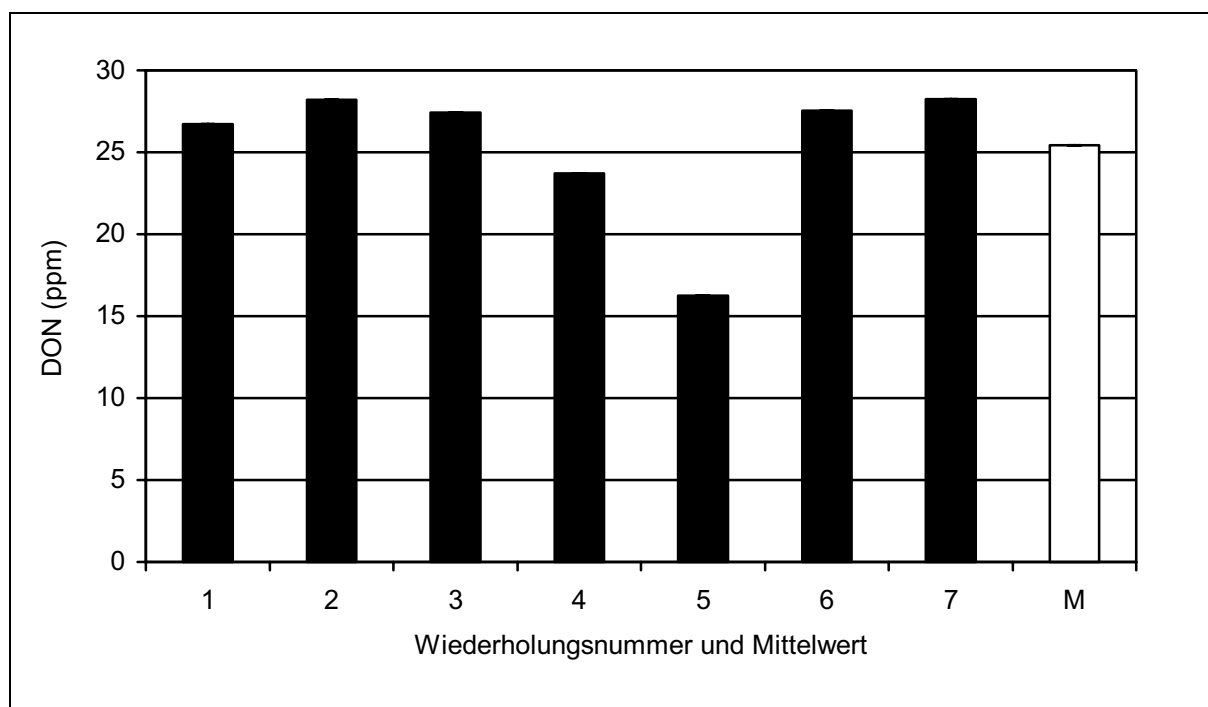


Abbildung 3.2: Reproduzierbarkeit der auf die Elution folgenden Aufarbeitungsschritte am Beispiel einer siebenfach wiederholten Probe eines Ährenextraktes (DON-Werte, nach der Höhe mit externem Standard über Integrator-Protokoll berechnet).

3.1.1.5 Lagerung der Proben

In einem ersten Versuch wurde getestet, wie sich eine Lagertemperatur auf die Standards auswirkt. Hierzu wurden Standard-Ampullen bei -20 °C und 4 °C für acht bzw. neun Tage gelagert und vorher zusätzlich mit Laborfilm verschlossen, da die Bördekappen alleine keine ausreichende Dichtigkeit gewährleisteten. Es wurden 12,5 ppm-Standards und 25 ppm-Standards untersucht.

Bei den 12,5 ppm Standards wurden zwei bei -20 °C gelagerte Ampullen gemessen (dreifach bzw. einfach) sowie eine bei 4 °C gelagerte Ampulle (dreifach). Bei den 25 ppm Standards wurden drei bei -20 °C gelagerte Ampullen gemessen (zwei dreifach und eine einfach) sowie eine bei 4 °C gelagerte Ampulle (Tab. 3.3). Die Berechnung erfolgte nach der Fläche der Peaks über die LCtalk-Software.

Tabelle 3.3: Vergleich der Auswirkung einer Lagertemperatur von 4 °C mit einer Lagertemperatur von -20 °C auf die Mykotoxinstandards nach 8 Tagen (12,5 ppm) bzw. 9 Tagen (25 ppm). Relativer Toxingehalt in %. Werte von -20 °C = 100 % gesetzt. - nicht analysiert.

	DON	ADON	NIV	ANIV	ZON
12,5 ppm	128,4	70,1	114,3	89,7	-
25 ppm	124,2	79,0	111,4	93,4	101,6

Für beide Konzentrationen zeigt sich bei den Trichothecen-derivaten ein vergleichbares Ergebnis. Die Konzentration von ADON und ANIV ist in den bei 4 °C gelagerten Standards geringer, aber die von DON und NIV höher. Dieser Effekt ist bei den 12,5 ppm-Standards stärker ausgeprägt. Für ZON ist keine Veränderung erkennbar.

Die Hauptursache hierfür ist vermutlich eine saure Hydrolyse der acetylierten Trichothecen-Derivate (siehe 2.9.5).

In einem weiteren Versuch wurde getestet, inwieweit eine Reproduzierbarkeit einer Messung von HPLC-Proben (Reis-Versuch 2) nach ca. acht Wochen Lagerung bei -70 °C gegeben war (Ampullen mit Laborfilm verschlossen, Tab. 3.4).

Die Abweichungen der zweiten von der ersten Messung bewegten sich bis auf wenige Ausnahmen bei den Einzelwerten zwischen 0 und 5 Prozent. Erwartungsgemäß waren die absoluten Abweichungen höher als die relativen, da sowohl positive als auch negative Abweichungen auftraten. Insgesamt war eine gute Reproduzierbarkeit gewährleistet, die sich im Rahmen der Reproduzierbarkeit der HPLC-Messungen bewegte (Tab. 3.9). Die absolute Abweichung bei ADON war insgesamt tendenziell höher als die bei DON. Allerdings war bei keiner der beiden Chargen ein einheitlicher Trend zu mehr DON und weniger ADON zu erkennen. Eine Veränderung der Proben, z. B. durch Deacetylierung wie für Tab. 3.3 angenommen, konnte während einer 55- bzw. 61tägigen Lagerung bei -70 °C also nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3.4: Daten zur Reproduzierbarkeit der Messung von Toxin-Gehalten in Reis-Proben. Erneute HPLC-Analyse zweier Chargen (A nach 61 Tagen (n = 6) bzw. B nach 55 Tagen (n = 6), Lagerung bei -70 °C). Jeder der sechs Einzelwerte ist der Mittelwert aus zwei Parallelansätzen. Als Datengrundlage dienen jeweils die prozentualen Abweichungen der zweiten Messung von der ersten Messung (= 100 % gesetzt). Charge A (Charge B in Klammern), prozentuale Abweichung.

	DON	ADON
Mittelwert der absoluten Abweichung von der ersten Messung	1,8 (1,7)	2,3 (2,2)
Mittelwert der relativen Abweichung von der ersten Messung	0,5 (-1,6)	-1,9 (1,8)
maximale positive Abweichung	5,3 (0,4)	1,0 (2,8)
maximale negative Abweichung	-2,1 (-2,9)	-6,5 (-1,2)

3.1.2 Ergebnisse zur Analytik der Mykotoxine (HPLC)

3.1.2.1 Kalibrierkurven

Hier sollen exemplarisch einige Kalibrierkurven gezeigt werden (Abb. 3.3, 3.4, 3.5). Die Geraden stellen die lineare Regression der jeweiligen Datenpunkte dar (Office 97). Alle Kalibrierkurven wurden mit der Methode M2 gemessen. Kalibrierkurven für die übrigen Toxine befinden sich im Anhang (A.11).

Für den getesteten Bereich konnte für alle Toxine von einem linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Detektorsignal ausgegangen werden, wie es das Lambert-Beer'sche Gesetz erwarten ließ (Tab. 3.5, Formel 2.4). Eine Kontrollmessung für DON und ADON zeigte, dass ein linearer Zusammenhang auch für eine Konzentration von 125 ppm noch uneingeschränkt gegeben ist. Höhere Konzentrationen in den Proben wurden durch lineare Extrapolation berechnet.

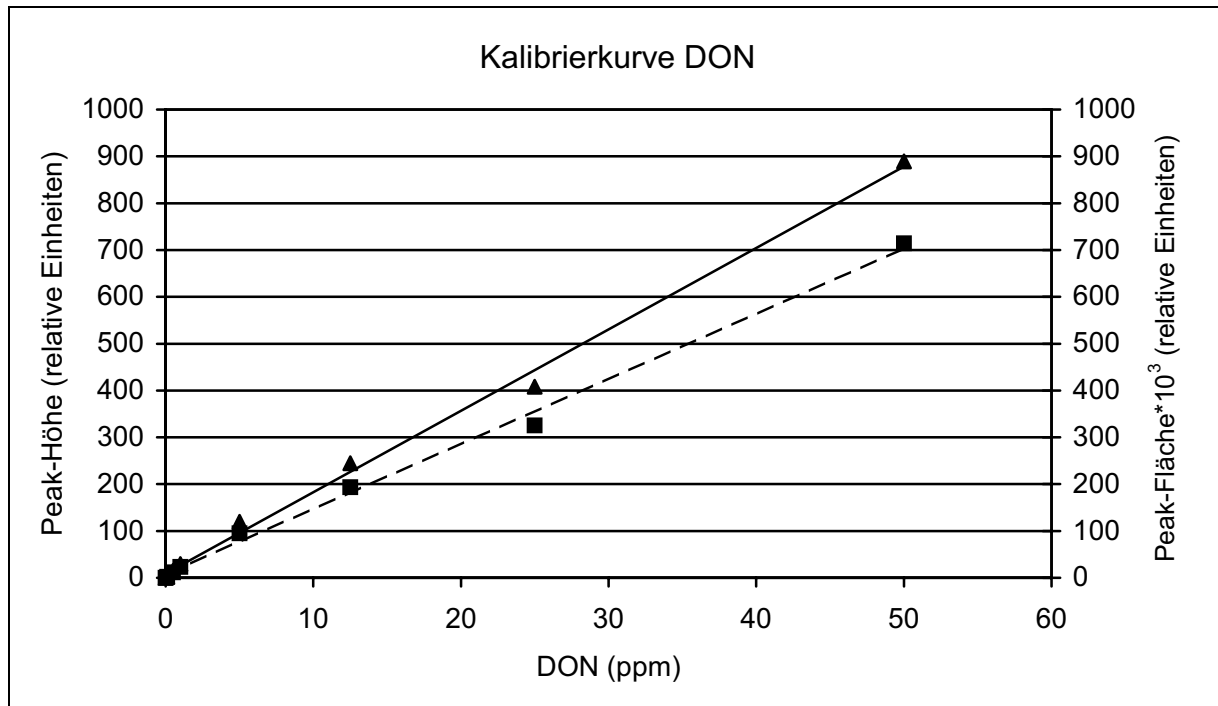


Abbildung 3.3: Kalibrierkurve für DON (Alter des Standards ca. 8 Wochen, Methode M2, 220 nm). Relative Einheiten von LC-Talk-Software. ▲ = flächenbezogene Daten (—); ■ = höhenbezogene Daten (- - -).

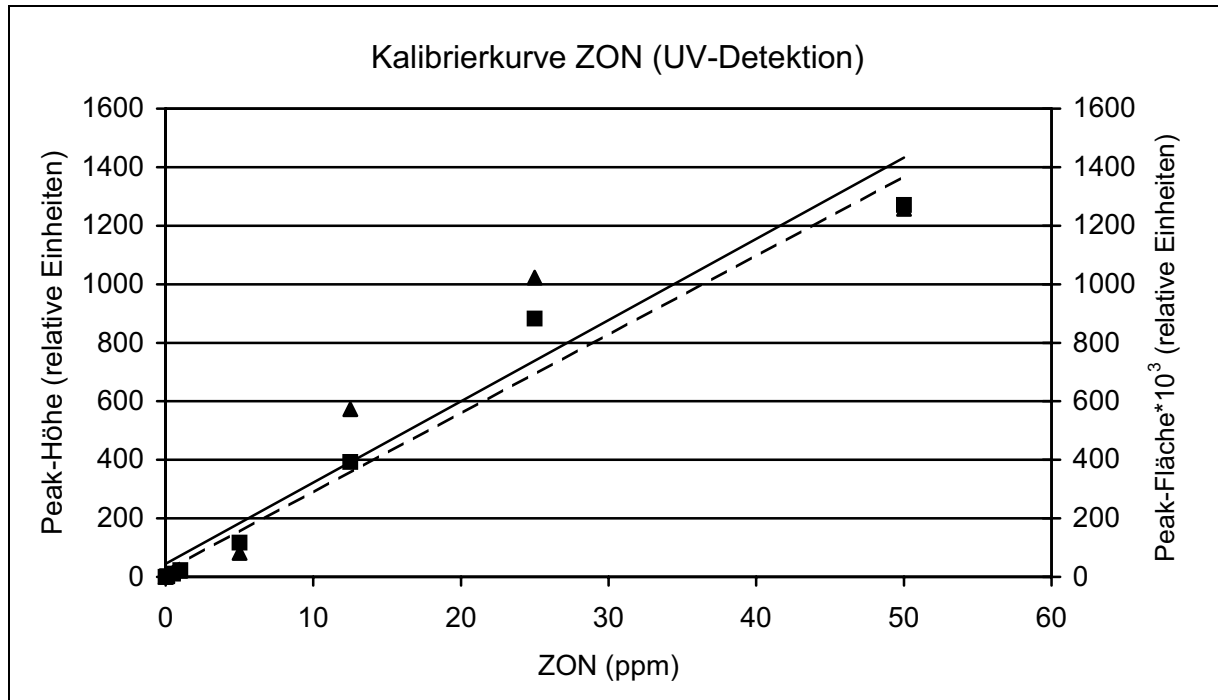


Abbildung 3.4: Kalibrierkurve für ZON, UV-Detektion (Alter des Standards ca. 8 Wochen; Methode M2; UV-Detektion, 236 nm). Relative Einheiten von LC-Talk-Software. ▲ = flächenbezogene Daten (—); ■ = höhenbezogene Daten (- - -).

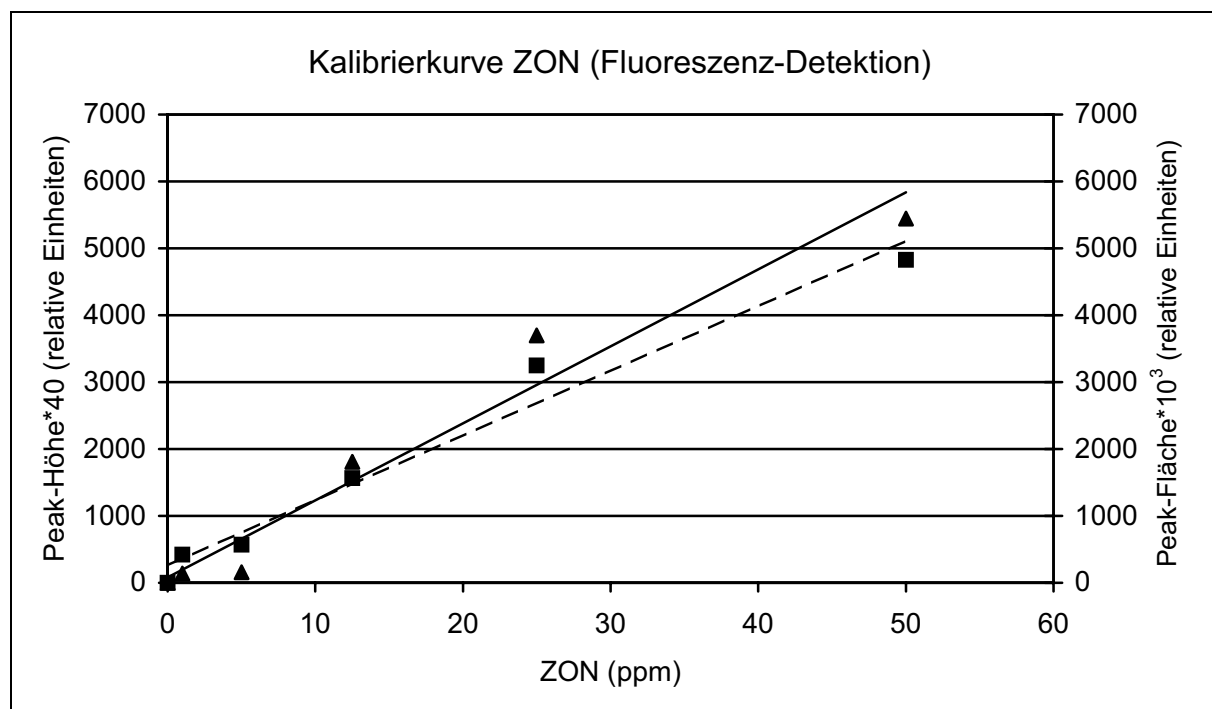


Abbildung 3.5: Kalibrierkurve für ZON, Fluoreszenz-Detektion (Alter des Standards ca. 4 Monate; Methode M2; Anregung bei 274 nm, Emission bei 470 nm). Relative Einheiten direkt vom Integrator. ▲ = flächenbezogene Daten (—); ■ = höhenbezogene Daten (- - -).

Tabelle 3.5: Bestimmtheitsmaß (R^2) für die Kalibrierkurven der einzelnen Toxine. n.d. = nicht sicher detektierbar.

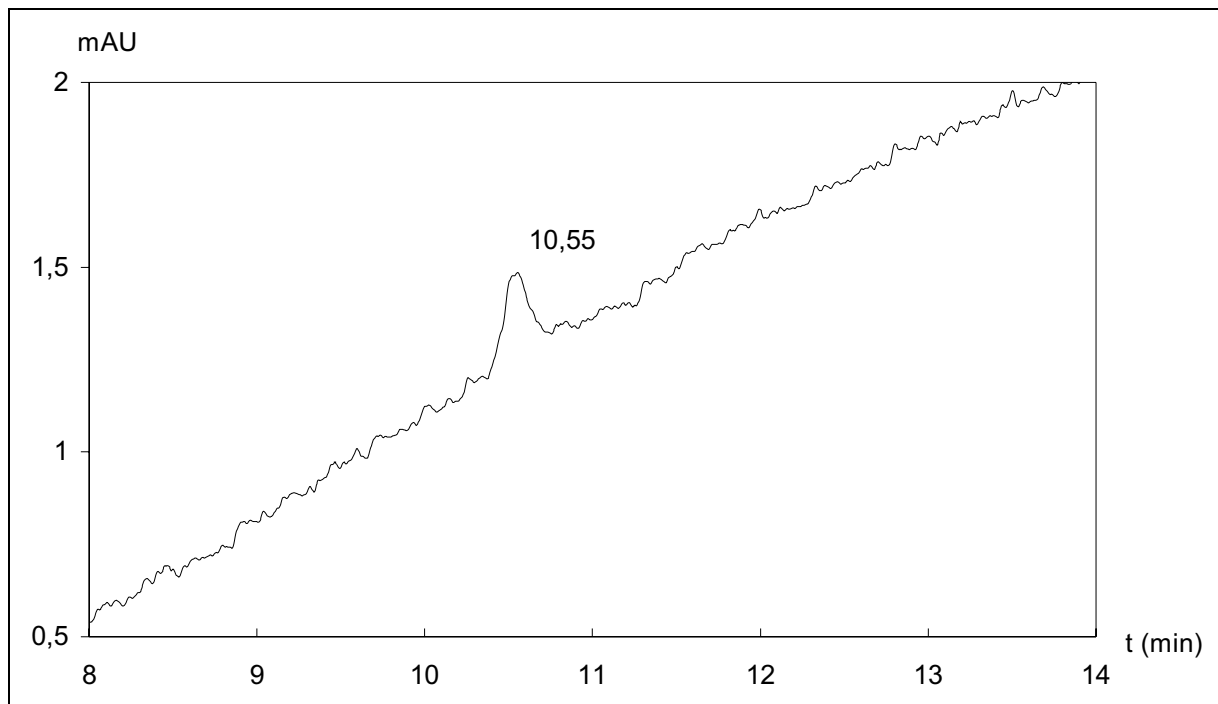
		DON	3ADON	NIV	ANIV	ZON (UV)	ZON (FL)
Fläche des Peaks	0-50 ppm	0,9963	0,9961	0,9995	0,9993	0,9124	0,9591
Fläche des Peaks	0-5 ppm	0,9973	0,9638	0,9986	0,9882	0,9936	n.d.
Höhe des Peaks	0-50 ppm	0,9962	0,9957	0,9993	0,9988	0,9699	0,9717
Höhe des Peaks	0-5 ppm	0,9977	0,9651	0,9983	0,9926	1	n.d.

3.1.2.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze für DON lag bei etwa 0,1 ppm für Standard-Substanz (bei 20 µl Injektion entspricht das 2 ng; Abb. 3.6, Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Injizierte Toxinmengen (20 µl Probenschleife).

Konzentration im Standard (ppm)	0,1	0,5	1	5	12,5	25	50
Toxinmenge (ng)	2	10	20	100	250	500	1000

**Abbildung 3.6: Ausschnitt aus einem HPLC-Chromatogramm eines 0,1 ppm-Misch-Standards (bei 220 nm, Methode M2). DON bei 10,55. Skalierung beachten!**

Da durch die Extraktion ein Verdünnungseffekt auftrat (Tab. 2.8), lag die Nachweisgrenze für die Ährenproben bei etwa 0,54 ppm (bei Gesamtextraktionsvolumen von 27 ml/g TM) und für Reisproben bei etwa 0,14 ppm (bei Gesamtextraktionsvolumen von 7 ml/g TM).

3.1.2.3 Wiederfindungsrate

Bei den Tests zur Wiederfindungsrate wurde die auch in den Versuchen vorliegende Matrix mit einer definierten Menge an Mykotoxin-Standard-Substanz versetzt. In einem ersten Versuch wurde die Reis-Matrix mit verschiedenen Extraktionsmethoden untersucht, bei einem weiteren Versuch die Ähren-Matrix bei zwei verschiedenen Konzentrationen (Tab. 3.7 und Tab. 3.8).

3.1.2.3.1 Reis-Matrix

Zu 2 g geschrotetem Reis wurde soviel Volumen eines hoch konzentrierten Mykotoxin-Standard-Gemischs gegeben, dass in jeder der Proben je 39 ppm DON, 3ADON, NIV, ANIV und ZON vorlagen. Dies entsprach 30 ppm in der späteren HPLC-Probe (Messlösung). Es wurden acht Parallelansätze angelegt, von denen jeweils 4 mit 10 % Methanol in Wasser bzw. 85% Methanol in Wasser extrahiert wurden. Die beiden Kontrollen wurden nicht mit Toxin versetzt sondern mit dem reinen Lösungsmittel. Ansonsten folgte die Extraktion und die weitere Bearbeitung der oben beschriebenen Methode, jedoch mit 6,5 ml (3,5/1,5/1,5) Extraktionsmittel pro Gramm Trockenmasse (Tab. 2.8). Jede der beiden Varianten (10% bzw. 85%) wurde erneut gesplittet und ab der Elution doppelt weiter verarbeitet. Die eine Hälfte der Proben wurde nach dem Einengen am Rotationsverdampfer in 12,5 % Methanol wieder aufgenommen, die andere Hälfte in 100 % Methanol.

Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte mit Hilfe eines parallel zu den Proben aus derselben Stammlösung angesetzten 30 ppm-Standards (\cong 39 ppm im Probenmaterial). Als Berechnungs-Grundlage dienten die Integrator-Protokolle mit Störpeak-Korrektur nach der Höhe der Peaks. Abb. 3.7 zeigt ein mit der LCtalk-Software ausgewertetes Chromatogramm für die Trichothecene.

Die HPLC-Messungen wurden nach der unter 2.9.4.2 beschriebenen Standard-Methode für Reis-Matrix durchgeführt. Die Detektion erfolgte für alle Toxine im UV-Bereich bei 220 nm und für ZON außerdem gesondert mittels Fluoreszenzdetektion (Exc. 274 nm, Em. 470 nm). Da diese Fluoreszenzmessung erst rund 7 Monate später durchgeführt wurde (Leihgerät), wurde die Messung des Standards mit dem von der ersten Messung (UV-Signal) abgeglichen. Die Berechnung erfolgte mit dem Integrator-Protokoll mit Störpeak-Korrektur nach der Peak-Fläche.

In Abhängigkeit vom Extraktionsmittel traten deutliche Unterschiede in der Wiederfindung auf. Bei 10 % Methanol war die Wiederfindung für DON, ADON und ANIV signifikant besser als bei 85 % Methanol (z. B. DON 82 % gegenüber 61 %).

Tabelle 3.7: Wiederfindungsrate verschiedener Mykotoxine (je 39 ppm) in der Reis-Matrix mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden in Prozent. Mittelwert aus vier Parallelansätzen \pm Standardabweichung. Mit denselben Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, statistischer Vergleich innerhalb der Spalten). ¹ Mittelwert aus nur zwei Parallelen. - nicht analysiert.

Extraktion (% MeOH)	Wiederauf- nahme in (% MeOH)	DON	3ADON	NIV	ANIV	ZON (UV)	ZON (FL)
10	12,5	78,4 \pm 1,8 a	78,0 \pm 1,8 a	31,8 \pm 0,9 b	86,5 \pm 4,9 a	7,5 \pm 1,8 ¹ b	6,3 \pm 1,4 b
10	100	82,1 \pm 5,2 a	80,4 \pm 3,0 a	35,2 \pm 1,3 b	84,7 \pm 3,3 a	12,1 \pm 1,4 ¹ b	-
85	12,5	64,7 \pm 5,5 b	64,1 \pm 7,9 b	57,8 \pm 3,5 a	69,4 \pm 6,7 b	69,1 \pm 12,3 ¹ a	69,2 \pm 2,3 a
85	100	61,1 \pm 7,3 b	64,1 \pm 5,9 b	52,5 \pm 6,2 a	59,3 \pm 4,0 b	84,0 \pm 14,2 a	-

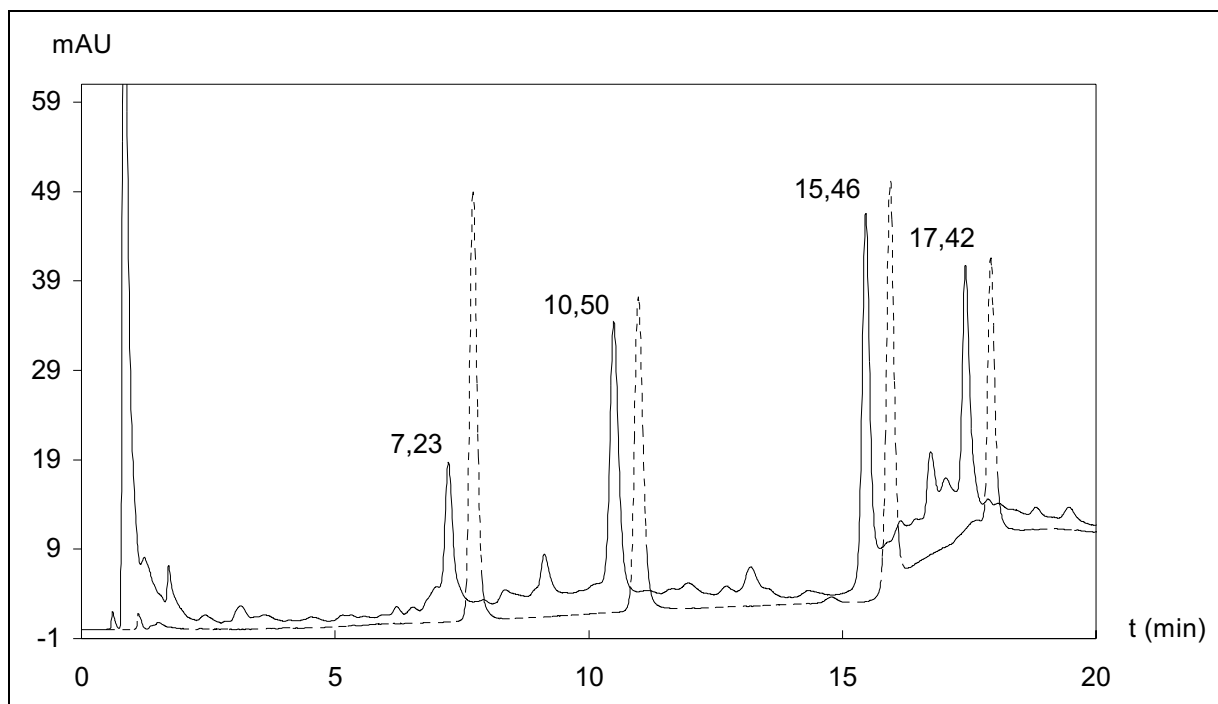


Abbildung 3.7: HPLC-Chromatogramm zur Wiederfindung in Reis-Matrix (Trichothecene bei 220 nm, Methode M2). NIV bei 7,23; DON bei 10,50; ANIV bei 15,46; ADON bei 17,42. (—) = Reis-Matrix + Mykotoxine; (- - -) = Misch-Standard der Mykotoxine (um +0,5 Min. versetzt aufgetragen). Die Standard-Konzentration von 30 ppm entspricht unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte einer Wiederfindung von 100 % der 39 ppm Toxin im Probenmaterial.

NIV und ZON wurden bei 85 % Methanol signifikant effektiver extrahiert (z.B. ZON 84 % gegenüber 12 % Wiederfindung).

Der Einfluss der Zusammensetzung des Lösungsmittels zur Wiederaufnahme nach dem Einengen am Rotations-Verdampfer war in keinem Fall signifikant.

Für ZON traten keine Unterschiede zwischen einer Messung mit UV-Detektion (236 nm) oder Fluoreszenz-Detektion (Exc. 274 nm, Em. 470 nm) auf.

Obwohl die Wiederfindung von ZON bei 10 % Methanol mit 6 % bis 12 % (je nach Variante) sehr niedrig lag und der Wert für NIV mit 32 % bzw. 35 % auch noch deutlich unter 50 % war, wurde routinemäßig mit 10 % Methanol extrahiert.

Die bei den verwendeten *Fusarium*-Isolaten vorherrschenden Trichothecene DON und ADON zeigten hier eine bessere Wiederfindung als NIV. Außerdem war ein großer Einfluss von ZON als Aggressivitätsfaktor mangels akuter Toxizität nicht zu erwarten, so dass dieser Metabolit verglichen mit den Trichothecenen für die Fragestellung der Gesamtarbeit voraussichtlich nur von untergeordneter Bedeutung war.

Die Wiederaufnahme der Probe erfolgte in 12,5 % Methanol.

Eine Korrektur nach der Wiederfindung wurde für keines der Mykotoxine vorgenommen. Die Ergebnisse für ZON und NIV werden in der Diskussion aber im Licht ihrer niedrigen Wiederfindung bewertet.

3.1.2.3.2 Ähren-Matrix

Zu 0,8 g gemahlenem unbefallenem, jungem Ährenmaterial (Sorte Picolo, Stadium EC61 bis EC69) wurde soviel Volumen eines hochkonzentrierten Mykotoxin-Misch-Standards gegeben, dass in fünf der 10 Proben je 8,1 ppm DON, 3ADON, NIV, ANIV und ZON vorlagen, in fünf weiteren Proben je 81 ppm derselben Toxine. Dies entsprach 1,5 ppm bzw. 15 ppm in der HPLC-Probe (Messlösung). Die beiden Kontrollen wurden nicht mit Toxin versetzt sondern mit dem reinen Lösungsmittel. Ansonsten folgte die Extraktion und die weitere Bearbeitung der oben beschriebenen Methode mit 27 ml Extraktionsmittel pro Gramm Trockenmasse (Tab. 2.8).

Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte mit Hilfe eines parallel zu den Proben aus derselben Stammlösung angesetzten 1,5 ppm- bzw. 15 ppm-Standards (\cong 8,1 ppm bzw. 81 ppm jeden Toxins im Ähren-Material). Als Berechnungsgrundlage dienten hier die

Ergebnisse der computergestützten Integration mit Störpeak-Korrektur nach der Höhe der Peaks.

Tabelle 3.8: Wiederfindungsrate unterschiedlicher Mykotoxine (jeweils 8,1 ppm bzw. 81 ppm) in der Ähren-Matrix in Prozent. Mittelwert aus 5 Parallelansätzen \pm Standardabweichung. Mit denselben Buchstaben gekennzeichnete Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, statistischer Vergleich innerhalb der Spalten). n.d. = nicht detektierbar.

	DON	3ADON	NIV	ANIV	ZON
8,1 ppm	102,1 \pm 6,9 a	54,9 \pm 9,6 b	n.d.	91,1 \pm 3,9 a	n.d.
81 ppm	104,9 \pm 5,3 a	77,9 \pm 6,4 a	n.d.	82,9 \pm 5,8 b	4,6 \pm 1,0

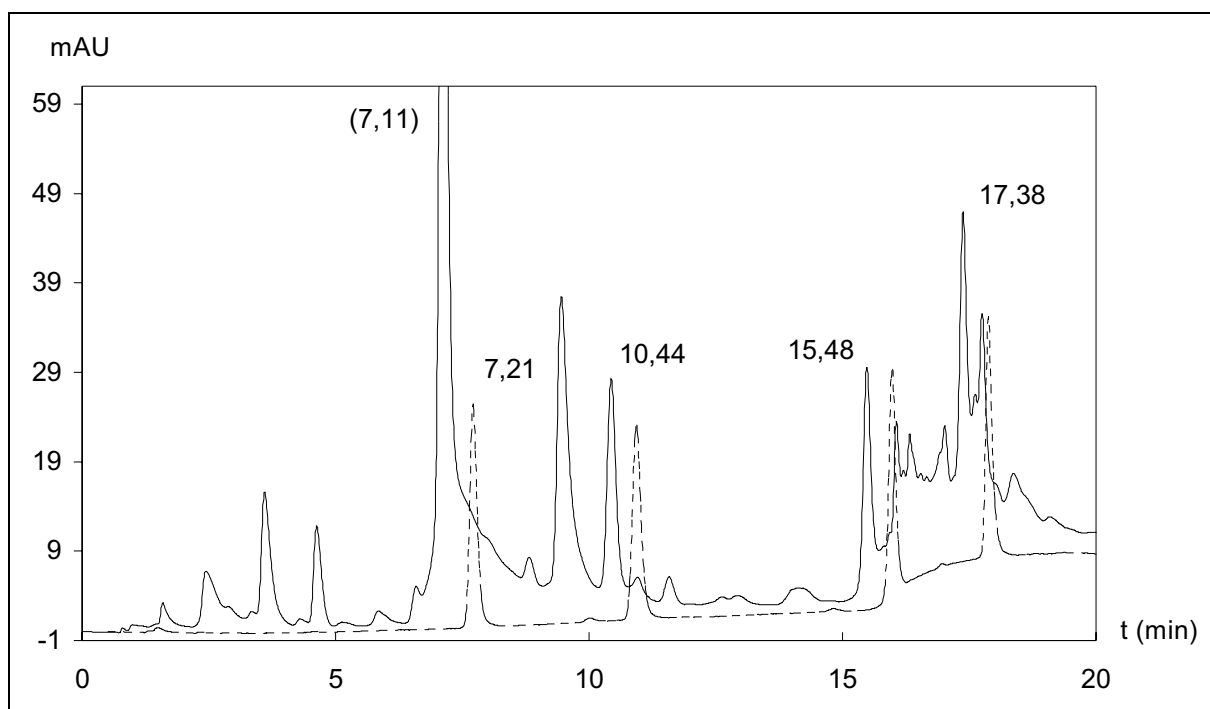


Abbildung 3.8: HPLC-Chromatogramm zur Wiederfindung in Ähren-Matrix (Trichothecene bei 220 nm, Methode M2). NIV bei 7,21 (Sollwert; von Störpeak bei 7,11 überlagert), DON bei 10,44, ANIV bei 15,48, ADON bei 17,38. (—) = Ähren-Matrix + Mykotoxine; (- - -) = Misch-Standard der Mykotoxine (um +0,5 Min. versetzt aufgetragen). Die Standard-Konzentration von 15 ppm entspricht unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte einer Wiederfindung von 100 % der 81 ppm Toxin im Probenmaterial.

Die HPLC-Messungen wurden ebenfalls nach der unter 2.9.4.2 beschriebenen Standard-Methode für Reis-Matrix durchgeführt. Die Detektion erfolgte für alle Toxine im UV-Bereich, da der nur leihweise vorhandene Fluoreszenz-Detektor nicht mehr zur Verfügung stand.

Bei DON traten keine signifikanten Unterschiede in der Wiederfindung zwischen 8,1 ppm und 81 ppm auf (102 % gegenüber 105 %, Tab. 3.8).

ADON zeigte hingegen bei 81 ppm eine signifikant höhere Wiederfindung als bei 8,1 ppm (78 % gegenüber 55 %).

Für ANIV ist die Wiederfindung bei 8,1 ppm mit 91 % nur um 8 % besser als bei 81 ppm, aber dieser Unterschied war signifikant.

Für ZON war die Wiederfindung auch in der Ähren-Matrix mit knapp 5 % vergleichsweise niedrig. Ein Nachweis der 8,1 ppm-Variante war nicht möglich.

NIV konnte in der Ähren-Matrix aufgrund eines Störpeaks nicht detektiert werden (Abb. 3.8 und 3.58).

3.1.2.4 Reproduzierbarkeit der HPLC

Zum Test der Reproduzierbarkeit der HPLC-Messungen wurde ein Standard (DON, 50 ppm) an zwei Messtagen im Abstand von zwei Tagen an einem Tag dreimal, am anderen viermal gemessen. In Tab. 3.9 ist dargestellt, wie sehr die Messungen am zweiten Messtag vom gemeinsamen Mittelwert dieses Messtags abweichen und wie sehr die Messungen des zweiten Messtags vom Mittelwert des ersten Messtags abweichen.

Bei der Messung der Standards ist eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen, was sowohl für denselben Messtag als auch für den Vergleich mit einem anderen Messtag gilt. Bei einem Vergleich von Ährenproben an diesen beiden verschiedenen Messtagen fiel das Ergebnis schlechter aus. Die verwendete ältere Methode M1a (siehe Anhang A.11) konnte den DON-Peak nicht von einem relativ großen Störpeak trennen, was vermutlich die Haupt-Ursache für diese schlechte Reproduzierbarkeit war. Dies galt vor allem für die flächenbezogenen Daten, weniger für die höhenbezogenen Werte. Der Ähren-Versuch 1, der mit der Methode M1a gemessen worden war, wurde nach Höhe ausgewertet. Die schlechte Trennung um den DON-Peak in der Ähren-Matrix war der Grund für die Entwicklung der Methode M1 (siehe Tab. 2.10).

Tabelle 3.9: Reproduzierbarkeit der HPLC-Messungen: Prozentuale Abweichungen (relativ und absolut) der DON Standard-Messungen vom Mittelwert desselben Messtags und vom Mittelwert eines anderen Messtags.

	... der vier Messungen des 2. Messtags vom gemeinsamen Mittelwert in %		... der Messungen des 2. Messtags vom Mittelwert des 1. Messtags in %	
	Höhe	Fläche	Höhe	Fläche
rel. Abweichung ...	0 (-4,0 bis +3,0)	0 (-1,9 bis +2,5)	0 (-4,0 bis +3,0)	-0,8 (-2,7 bis +1,7)
abs. Abweichung ...	2,2	1,3	2,2	1,2

3.2 Taxonomische Einordnung mittels PCR

Alle Isolate außer den Isolaten 44, 45 und 46 (allgemeine Einordnung in die Sektion *Discolor*) waren von den Bezugsquellen als *F. graminearum* deklariert. Zur Absicherung der taxonomischen Einordnung wurde am Ende der experimentellen Arbeiten eine molekularbiologische Charakterisierung der verwendeten *Fusarium*-Isolate durchgeführt. Hierzu wurden in einer PCR pathogenspezifische Primer verwendet. Auf diese Weise wurden 50 der 54 verwendeten Isolate charakterisiert. Die vier nicht charakterisierten Isolate 30, 31, 32 und 33 stellten die Isolate 34, 35, 36 und 37 vor der Wirtspassage dar. Da durch die Wirtspassage keine molekularbiologische Veränderung zu erwarten war, wurde auf die Analyse dieser vier Ausgangs-Isolate verzichtet.

3.2.1 Ergebnisse zur Isolierung genomischer DNA

Die DNA wurde wie unter 2.4.2 erwähnt mit zwei verschiedenen Fertig-Systemen isoliert.

Für alle untersuchten Isolate verlief die DNA-Isolierung positiv (Abb. 3.9), auch wenn der Ertrag bei den einzelnen Isolaten unterschiedlich ausfiel.

Da kein RNase-Verdau durchgeführt wurde, ist am unteren Rand der Gel-Bahnen eine deutliche RNA-Bande erkennbar. Außerdem kann man deutliche Unterschiede in der

Produktqualität der beiden verwendeten Kits erkennen (Isolate 1-5 und 37 bis 54 Qiagen; Isolate 6-29 und 34-36 peQLab).

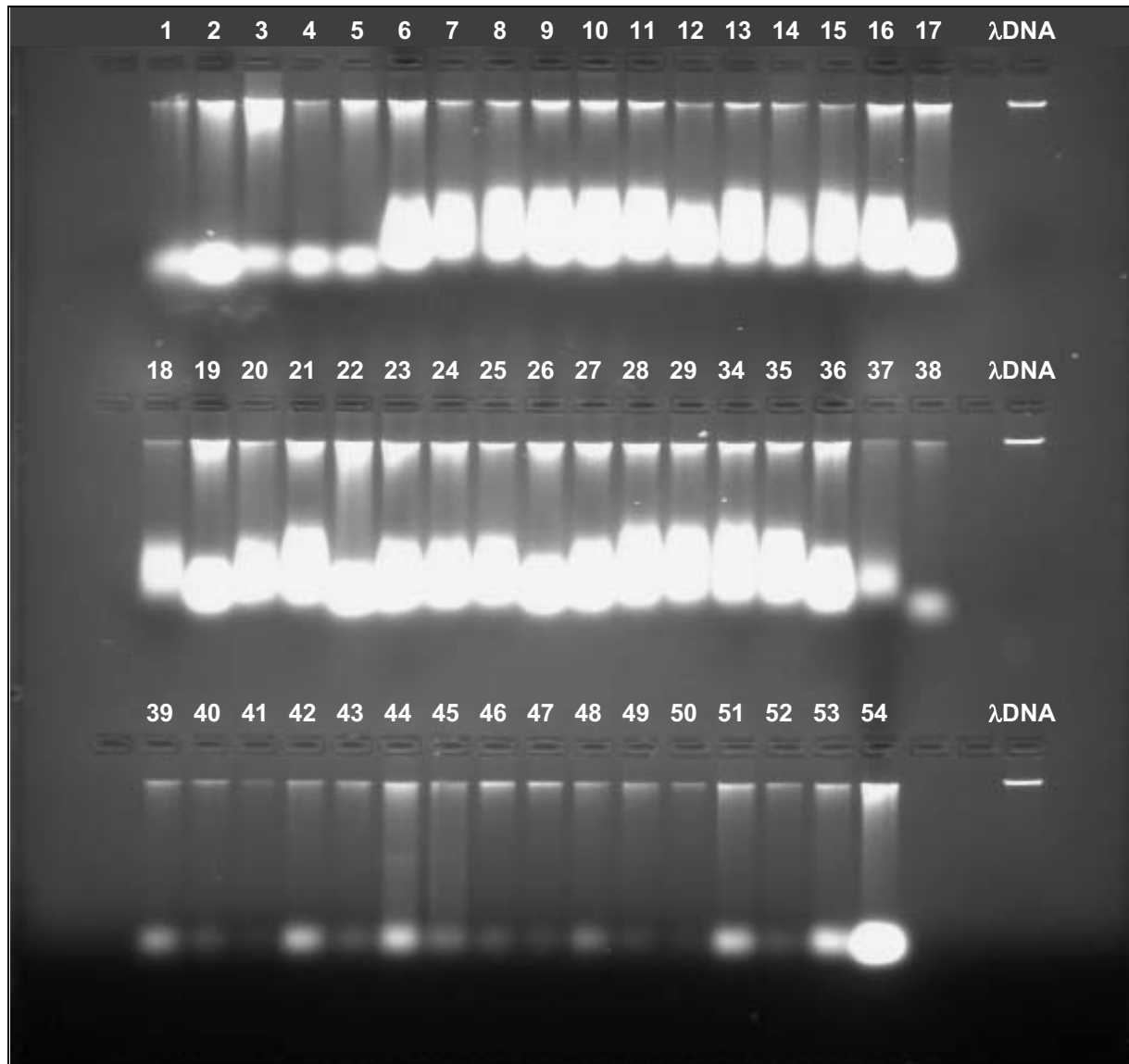


Abbildung 3.9: Agarose-Gel der DNA aller untersuchten *Fusarium*-Isolate (1 % Agarose, 10 µl Isolationsprodukt, 50 ng λ-DNA als Standard).

3.2.2 Ergebnisse zur PCR mit pathogenspezifischen Primern

Alle 50 untersuchten Isolate wurden auf *F. graminearum* und *F. culmorum* getestet. Isolate, die neben den Makrokonidien auch andere Sporenformen zeigten, wurde zusätzlich auf *F. avenaceum* und *F. poae* getestet.

In Abb. 3.10 und 3.11 sind die Ergebnisse der PCR mit dem für *F. graminearum* bzw. für *F. culmorum* spezifischen Primerpaar Fg-11 bzw. Fc-35 (siehe Anhang A.7) dargestellt.

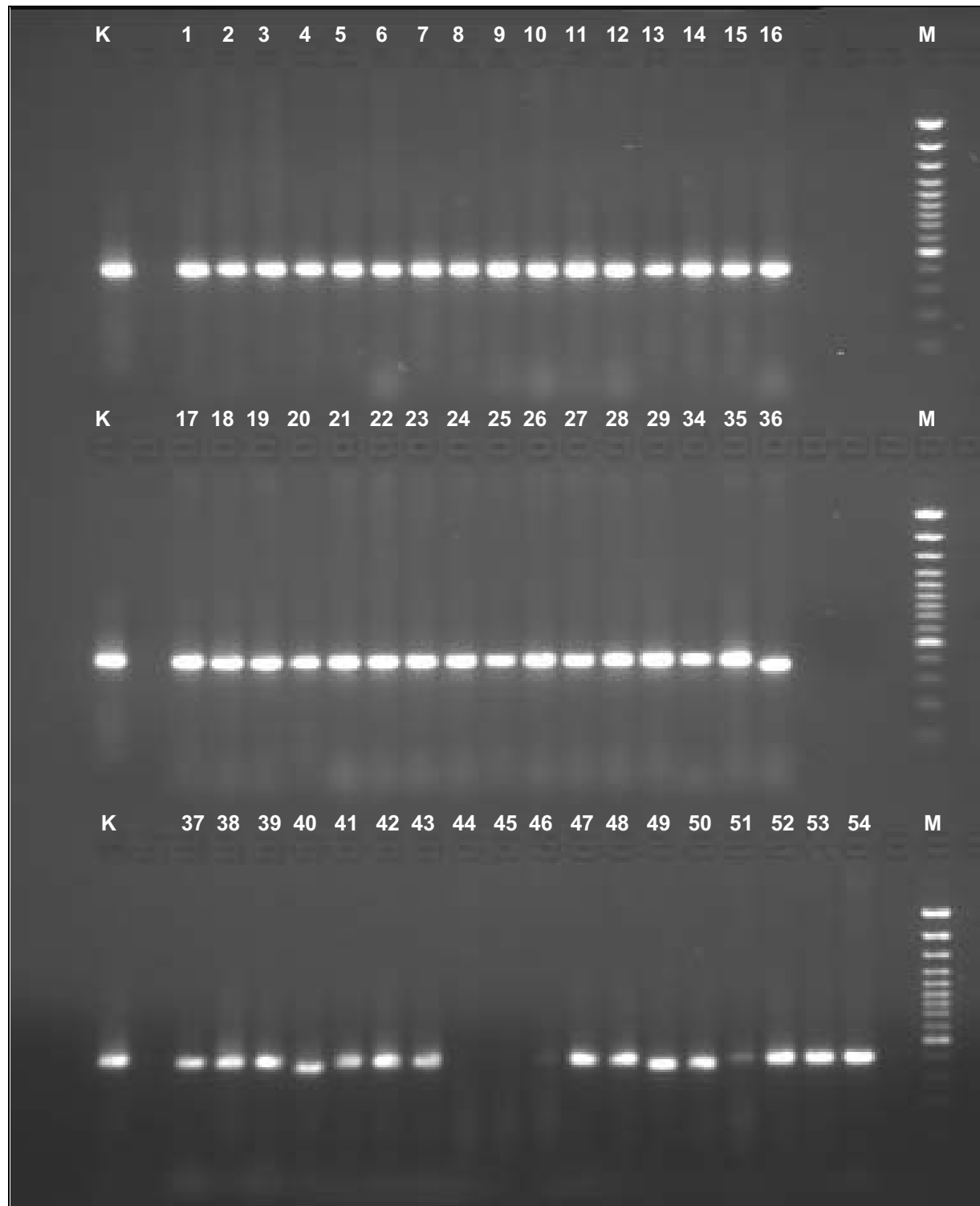


Abbildung 3.10: Agarose-Gel der PCR-Produkte aller 50 *Fusarium*-Isolate mit dem pathogenspezifischen Primerpaar für *F. graminearum* (Fg-11; 1,5 % Agarose, 20 µl PCR-Produkt). K = Kontroll-Isolat G2.1, M = Größen-Marker (416 ng DNA; von 100 - 3000 bp).

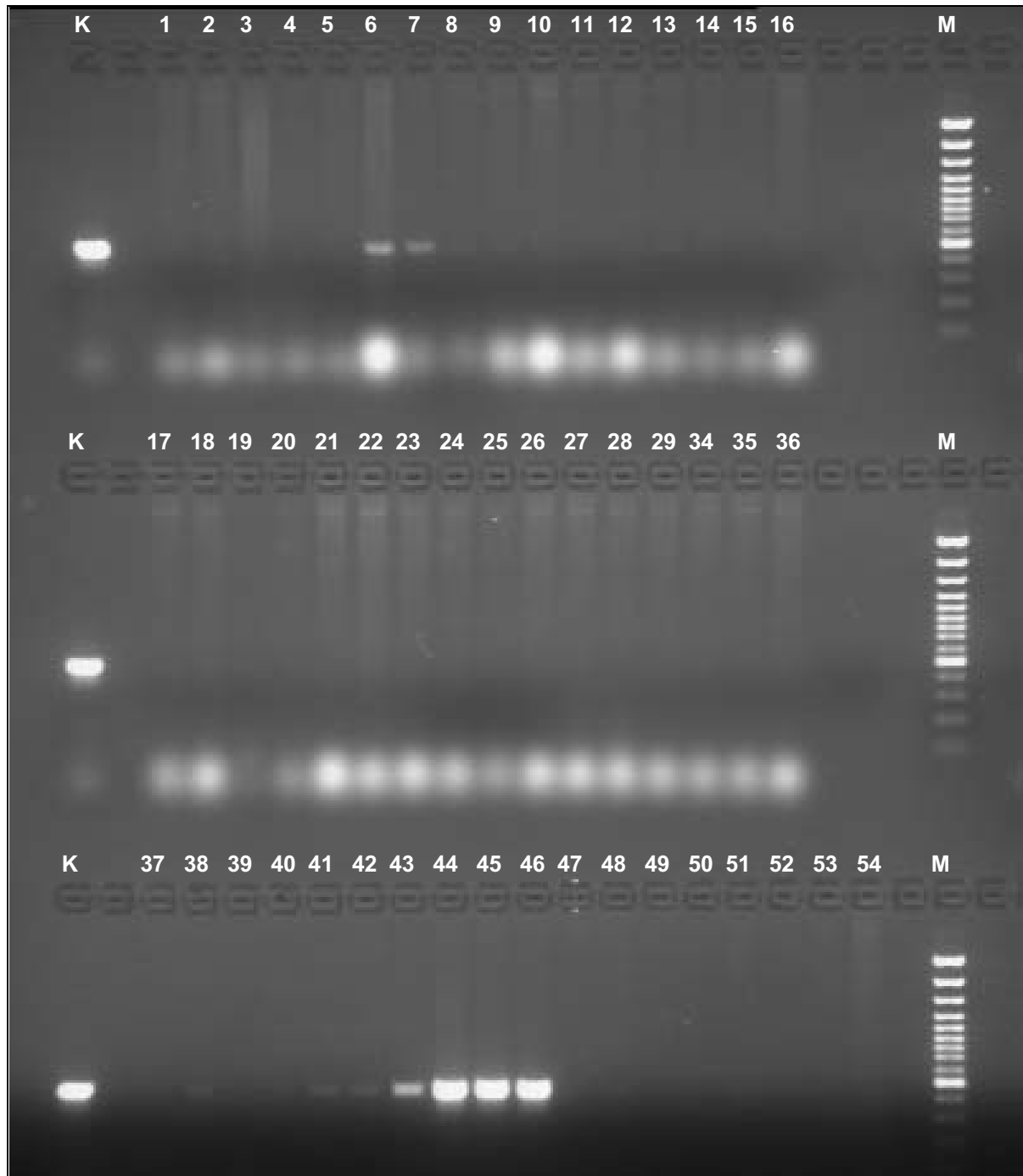


Abbildung 3.11: Agarose-Gel der PCR-Produkte aller 50 *Fusarium*-Isolate mit dem pathogenspezifischen Primerpaar für *F. culmorum* (Fc-35; 1,5 % Agarose, 20 µl PCR-Produkt). K = Kontroll-Isolat L5/97, M = Größen-Marker (416 ng DNA; von 100 - 3000 bp).

Für die Isolate 34 und 37 wurde für die PCR mit dem Fg-11-Primerpaar DNA aus einer erneuten DNA-Isolation verwendet (Abb. 3.10), da die DNA aus der ersten Isolation trotz sicherer taxonomischer Einordnung dieser beiden bekannten Isolate in der PCR für *F. graminearum* kein Signal zeigte.

Bei den meisten *Fusarium*-Isolaten zeigte sich eine deutliche Bande auf der Höhe des *F. graminearum* Kontroll-Isolats (Abb. 3.10). Diese Bande fehlte nur bei Isolat 44 vollständig. Bei Isolat 51 war sie relativ schwach. Noch schwächer war das Signal bei Isolat 46. Isolat 45 zeigte ein sehr schwaches Signal (siehe Anhang A.7). Die Banden der Isolate 36, 40, 49 und 50 sind etwas weiter gelaufen, was für ein kürzeres PCR-Fragment spricht.

Nur bei wenigen Isolaten war auf dem Gel eine Bande auf Höhe des *F. culmorum* Kontroll-Isolats vorhanden (Abb. 3.11). Die Isolate 44, 45 und 46 zeigten sehr starke Banden. Schwächere Banden waren bei den Isolaten 43, 6 und 7 ausgeprägt. Ein noch schwächeres Signal war bei den Isolaten 41, 42 und 38 zu erkennen.

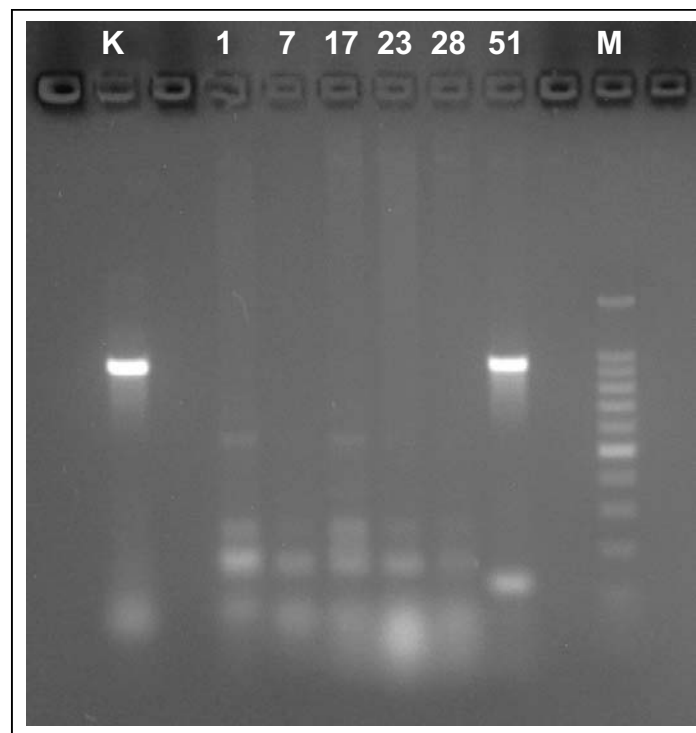


Abbildung 3.12: Agarose-Gel der PCR-Produkte der *Fusarium*-Isolate 1, 7, 17, 23, 28 und 51 mit dem pathogenspezifischen Primerpaar für *F. avenaceum* (Fa; 1,5 % Agarose, 20 µl PCR-Produkt). K = Kontroll-Isolat G3.1, M = Größen-Marker (416 ng DNA; von 100 - 3000 bp).

In Abb. 3.12 ist das Ergebnis der PCR mit dem für *F. avenaceum* spezifischen Primerpaar Fa (siehe Anhang A.7) dargestellt.

Von den sechs untersuchten Isolaten zeigt nur Isolat 51 eine Bande auf der Höhe des *F. avenaceum* Kontroll-Isolats (Abb. 3.12).

Für die Isolate 1, 7, 17, 23, 28 und 51 wurde auch eine PCR mit einem für *F. poae* spezifischen Primerpaar durchgeführt. Allerdings war der Nachweis von *F. poae* bei allen sechs untersuchten Isolaten negativ.

Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tab. 3.10 dargestellt. Die meisten Isolate lagen als reine *F. graminearum*-Isolate vor. Einige der *F. graminearum*-Isolate zeigten eine Verunreinigung mit *F. culmorum* (Isolate 6, 7, 38, 41, 42, 43). Dieses Signal war bei den Isolaten 38, 41 und 42 vergleichsweise schwach.

Es trat auch ein reines *F. culmorum*-Isolat auf (Isolat 44). Außerdem gab es zwei mit *F. graminearum* verunreinigte *F. culmorum*-Isolate (45 und 46).

Eine Sonderstellung nahm das Isolat 51 ein, bei dem es sich um ein *F. avenaceum*-Isolat handelte, das mit *F. graminearum* verunreinigt war. Außerdem legten mikroskopische Untersuchungen (viele Sporen, die für *F. avenaceum*-Mikrokonidien atypisch klein und zitronenförmig waren) die Vermutung nahe, dass hier eine dritte nicht näher bestimmte *Fusarium*-Art oder aber eine gattungsfremde Kontaminante auftrat.

Bei den Isolaten 7, 23 und 28 traten in einigen oder allen Kulturen *Aspergillus*-artige Strukturen auf. Solche Kontaminanten konnten durch die beschriebene PCR nicht erfasst werden, da keine *Aspergillus*-spezifischen Primer eingesetzt wurden.

Um eine mögliche Kreuzreaktion der Primer mit anderen *Fusarium*-Arten zu testen, wurden für die Primer von *F. graminearum* und *F. culmorum* zur Kontrolle die in Tab. 2.4 aufgeführten Isolate mitgetestet. Bei dem Primer-Paar für *F. culmorum* (Fc-35) war ein vergleichsweise schwaches Signal bei dem *F. poae*-Isolat zu erkennen, das von der Intensität etwa in der Größenordnung von Isolat 38 lag.

Die Ergebnisse zur Toxinproduktion *in vitro* und zur Aggressivität von den Isolaten 7, 23 und 28 (Fettdruck) werden wegen der pilzlichen Kontaminanten im folgenden nicht berücksichtigt. Nur die Werte für die 51 übrigen Isolate werden dargestellt.

Tabelle 3.10: Taxonomische Zuordnung der *Fusarium*-Isolate nach einer PCR mit pathogenspezifischen Primern. Bei Misch-Isolaten wird die dominierende Art zuerst genannt. Wenn nur undeutlich erkennbare Banden auftraten, dann ist die Art eingeklammert. K = mit vermutlich gattungsfremder Kontaminante kontaminiert. F = mit anderer *Fusarium*-Art kontaminiert.

	<i>Fusarium</i> -Art
1	<i>F. graminearum</i>
2	<i>F. graminearum</i>
3	<i>F. graminearum</i>
4	<i>F. graminearum</i>
5	<i>F. graminearum</i>
6	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
7	<i>F. graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>; K
8	<i>F. graminearum</i>
9	<i>F. graminearum</i>
10	<i>F. graminearum</i>
11	<i>F. graminearum</i>
12	<i>F. graminearum</i>
13	<i>F. graminearum</i>
14	<i>F. graminearum</i>
15	<i>F. graminearum</i>
16	<i>F. graminearum</i>
17	<i>F. graminearum</i>
18	<i>F. graminearum</i>
19	<i>F. graminearum</i>
20	<i>F. graminearum</i>
21	<i>F. graminearum</i>
22	<i>F. graminearum</i>
23	<i>F. graminearum</i>; K
24	<i>F. graminearum</i>
25	<i>F. graminearum</i>

	<i>Fusarium</i> -Art
26	<i>F. graminearum</i>
27	<i>F. graminearum</i>
28	<i>F. graminearum</i>; K
29	<i>F. graminearum</i>
34/30	<i>F. graminearum</i>
35/31	<i>F. graminearum</i>
36/32	<i>F. graminearum</i>
37/33	<i>F. graminearum</i>
38	<i>F. graminearum</i> , (<i>F. culmorum</i>)
39	<i>F. graminearum</i>
40	<i>F. graminearum</i>
41	<i>F. graminearum</i> , (<i>F. culmorum</i>)
42	<i>F. graminearum</i> , (<i>F. culmorum</i>)
43	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>
44	<i>F. culmorum</i>
45	<i>F. culmorum</i> , (<i>F. graminearum</i>)
46	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
47	<i>F. graminearum</i>
48	<i>F. graminearum</i>
49	<i>F. graminearum</i>
50	<i>F. graminearum</i>
51	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. graminearum</i> ; K/F
52	<i>F. graminearum</i>
53	<i>F. graminearum</i>
54	<i>F. graminearum</i>

3.3 Ergebnisse zur Toxinproduktion *in vitro*

3.3.1 Ergebnisse zum Verlauf der Trichothecenbildung

Bei keinem der hier untersuchten *Fusarium graminearum*-Isolate (Isolate 34, 35, 36 und 37) konnte NIV oder ANIV nachgewiesen werden. Substanzen mit ähnlicher Retentionszeit wie NIV oder ANIV waren nur in so geringer Konzentration vorhanden, dass eine Absicherung über die UV-Spektren nicht durchführbar war.

In Abb. 3.13 bis 3.14 sind die Verläufe der ADON- und DON-Bildung der vier untersuchten Isolate dargestellt.

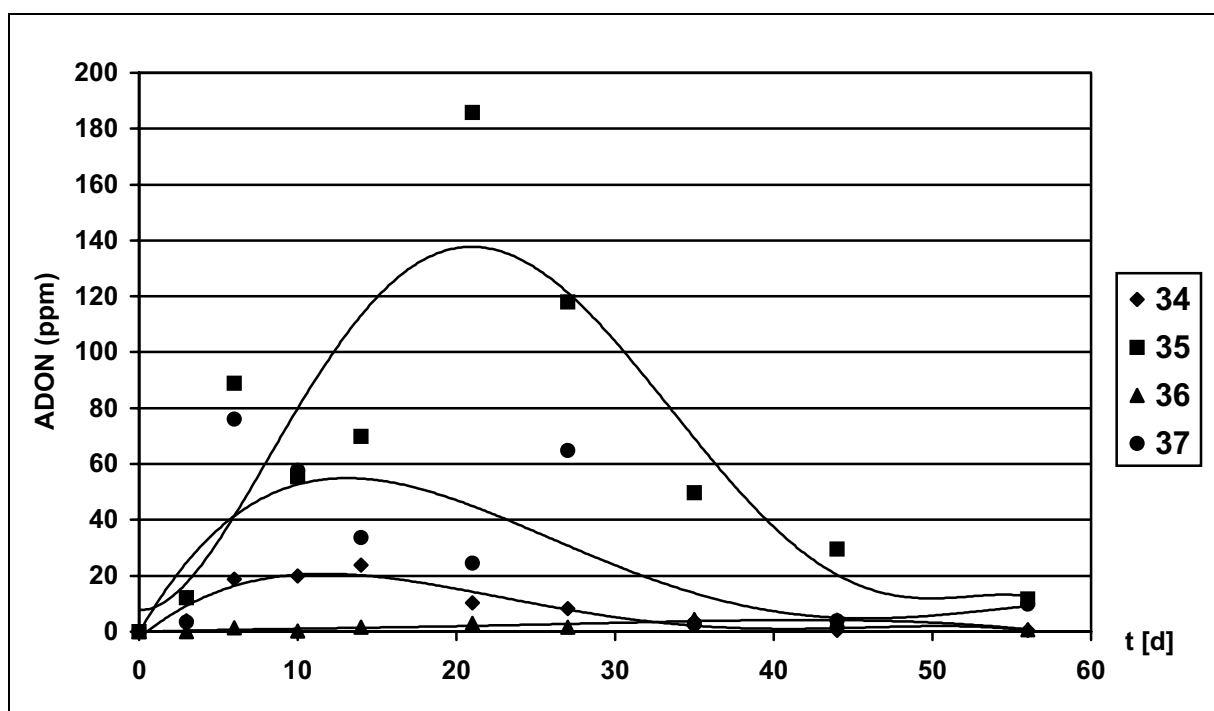


Abbildung 3.13: Verlauf der ADON-Bildung verschiedener *F. graminearum*-Isolate auf Reis *in vitro* von 0 bis 56 Tagen. Mittelwerte aus drei Einzelwerten. Regression: Polynom 4. Grades (Isolat 35: Polynom 5. Grades).

Die ADON-Bildung zeigte bei drei der vier Isolate einen charakterischen Verlauf, der aber deutliche Unterschiede im Niveau aufwies. ADON konnte nach drei Tagen nachgewiesen werden. Nach einem kurzen nahezu linearen Anstieg erreichten die Verläufe bei den Isolaten 34, 37, und 35 schon nach etwa 12, 13 oder 21 Tagen einen Höchstwert, um dann allmählich abzunehmen. Isolat 35 lag mit fast 140 ppm deutlich höher als die Isolate 37 (ca. 35 ppm)

oder 34 (etwa 20 ppm) in ihrem Höchstwert. Eine Sonderstellung nahm Isolat 36 ein, das insgesamt nur sehr geringe Mengen ADON bildete (4 ppm bei 35 Tagen als Höchstwert).

Isolat 35 unterschied sich von mindestens einem der anderen Isolate signifikant (außer 27 und 56 dpi), zu 3 dpi, 21 dpi, 35 dpi und 44 dpi sogar von allen drei anderen Isolaten. Zwischen den Isolaten 34, 36 und 37 bestanden hinsichtlich der ADON-Bildung nur vereinzelt signifikante Unterschiede.

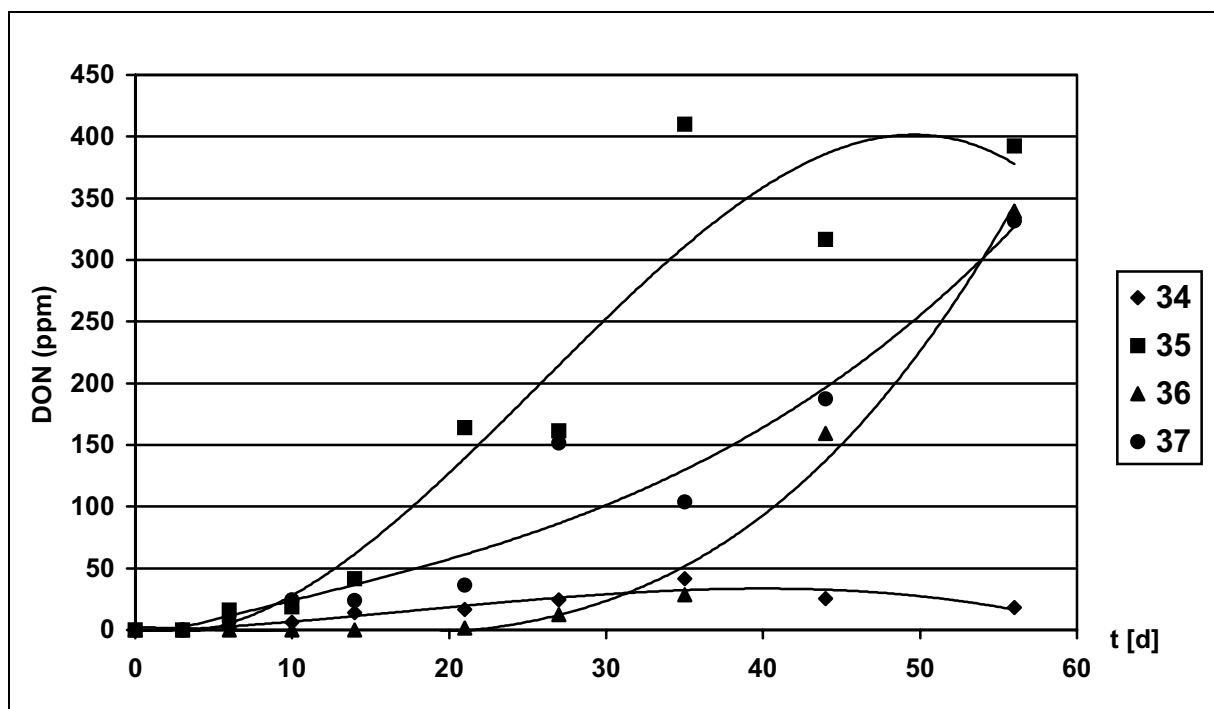


Abbildung 3.14: Verlauf der DON-Bildung verschiedener *F. graminearum*-Isolate auf Reis *in vitro* von 0 bis 56 Tagen. Mittelwerte aus drei Einzelwerten. Regression: Polynom 3. Grades.

Auch die DON-Bildung zeigte bei allen Isolaten deutliche Niveau-Unterschiede. Erste quantifizierbare DON-Mengen traten ab 6 dpi auf. Nach einem nahezu linearen Anstieg wurde bei den Isolaten 34 und 35 nach ca. 40 Tagen bzw. zwischen 45 und 50 Tagen ein Höchstwert erreicht, wobei Isolat 34 weniger DON bildete (etwa 35 ppm gegenüber 400 ppm). Dann nahmen die DON-Werte bei beiden Isolaten wieder ab. Die Isolate 36 und 37 zeigten einen Anstieg, der 56 Tage nach Inkubationsbeginn noch andauerte. Die DON-Bildung bei Isolat 36 setzte verzögert ab 21 Tagen ein, unterschied sich vom Niveau aber bei 56 Tagen nicht mehr von Isolat 37 (339 bzw. 332 ppm).

Bei der DON-Bildung gab es insgesamt weniger signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten als bei der Bildung von ADON. So gab es zu 3 dpi, 14 dpi, 27 dpi und 44 dpi keine signifikanten Unterschiede. An drei Terminen unterschied sich Isolat 35 von allen anderen Isolaten signifikant (6 dpi, 21 dpi, 35 dpi). Zwischen den drei übrigen Isolaten 34, 36 und 37 trat nur zu 10 dpi ein signifikanter Unterschied auf.

Die zeitliche Veränderung in der Dominanz in der Toxinbildung von ADON zu DON während der Fermentierung des Reis kann durch den Quotienten aus ADON- und DON-Gehalt verdeutlicht werden (Abb. 3.15).

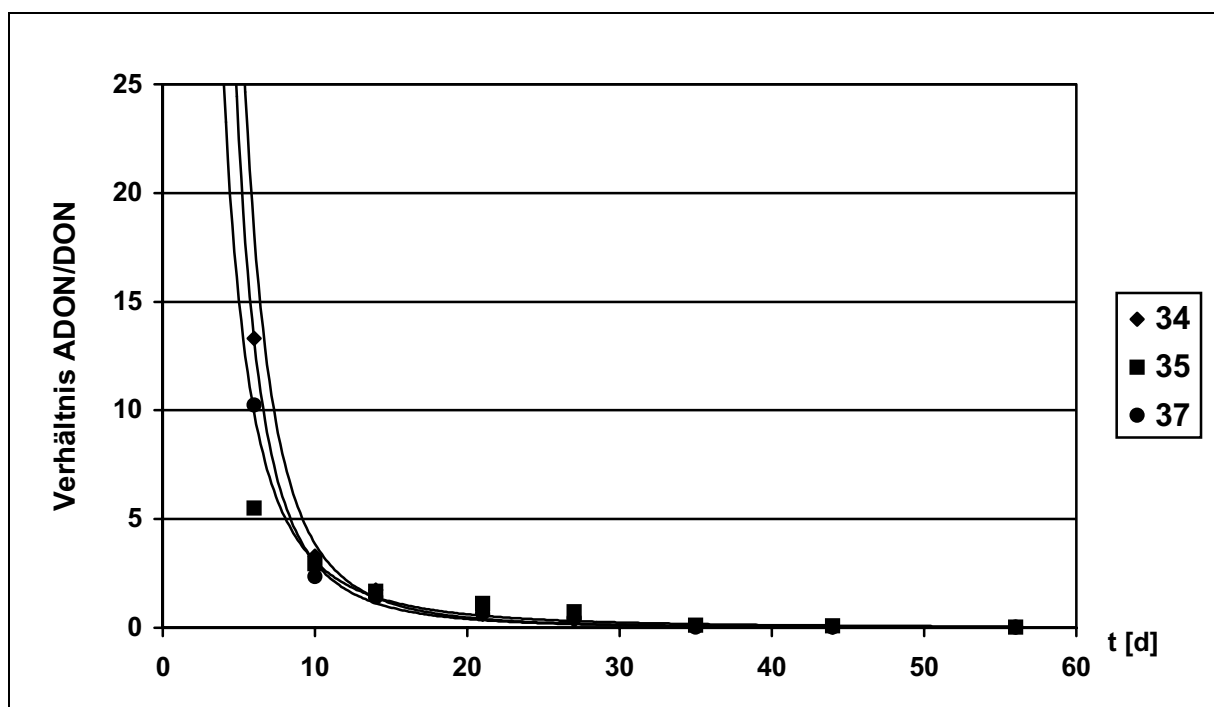


Abbildung 3.15: Quotient aus ADON- und DON-Bildung dreier *F. graminearum*-Isolate auf Reis *in vitro* von 0 bis 56. Regression: Potentiell.

Während ADON nach 6 Tagen noch deutlich dominierte (fünf- bis 13fache Konzentration von DON), wurde nach 21 Tagen bei zwei der drei Isolate mehr DON als ADON produziert (Quotient < 1). Nach 44 Tagen wurde bei alle Isolaten mindestens um den Faktor 10 weniger ADON als DON gebildet. Auf eine Darstellung von Isolat 36 wurde wegen der zu geringen Absolutwerte beider Toxine zu Beginn des Versuchs verzichtet.

3.3.2 Ergebnisse zum Screening-Test der Toxinbildung

Die Ergebnisse für die Toxinbildung der 47 *Fusarium*-Isolate (siehe Tab. 3.10) sind in Abb. 3.16 bis Abb. 3.20 dargestellt. Die kontaminierten Isolate 7, 23 und 28 wurden nicht berücksichtigt. Ebenso wurden die Isolate 34, 35, 36 und 37 nicht dargestellt (außer in der Gesamtdarstellung Abb. 3.21), da mit diesen Isolaten im Gegensatz zu allen übrigen eine Wirtspassage durchgeführt worden war. Ergebnisse zur Auswirkung einer Wirtspassage werden unter 3.6 vorgestellt.

In den Abbildungen sind die Isolate nach der taxonomischen Einordnung gruppiert dargestellt (die 38 reinen *F. graminearum* im unteren Teil, darüber die acht Misch-Isolate und oben das einzige reine *F. culmorum*-Isolat (Isolat 44)). Die statistische Verrechnung erfolgte ebenfalls nur innerhalb dieser Gruppen.

3.3.2.1 Bildung von DON (Abb. 3.16)

Die DON-Produktion reichte von 0,11 (Isolat 32) bis 1975 ppm (Isolat 54). Die maximale DON-Bildung der Misch-Isolate liegt mit 192 ppm unter dem Durchschnitt (Isolat 42).

Nur bei fünf der 47 Isolate konnte kein DON nachgewiesen werden (Isolate 41, 44, 45, 49, 51). Hiervon sind drei Misch-Isolate und das *F. culmorum*-Isolat betroffen. Acht der 42 verbleibenden Isolate bildeten weniger als 100 ppm DON (sieben davon *F. graminearum*), 19 Isolate zwischen 100 und 250 ppm (vier davon sind Misch-Isolate). Sieben weitere Isolate produzierten zwischen 250 und 500 ppm DON. Von den verbleibenden acht Isolaten bildeten sechs zwischen 500 und 1000 ppm DON, während zwei Isolate über 1000 ppm DON produzierten (Isolat 54 und Isolat 40). Der Mittelwert der DON-Bildung über alle DON bildenden Isolate betrug 321 ppm.

Isolat 54 unterschied sich hinsichtlich der DON-Bildung signifikant von allen anderen *F. graminearum*-Isolaten, Isolat 40 von allen außer Isolat 9, das mit 832 ppm ebenfalls beträchtliche Mengen DON produzierte.

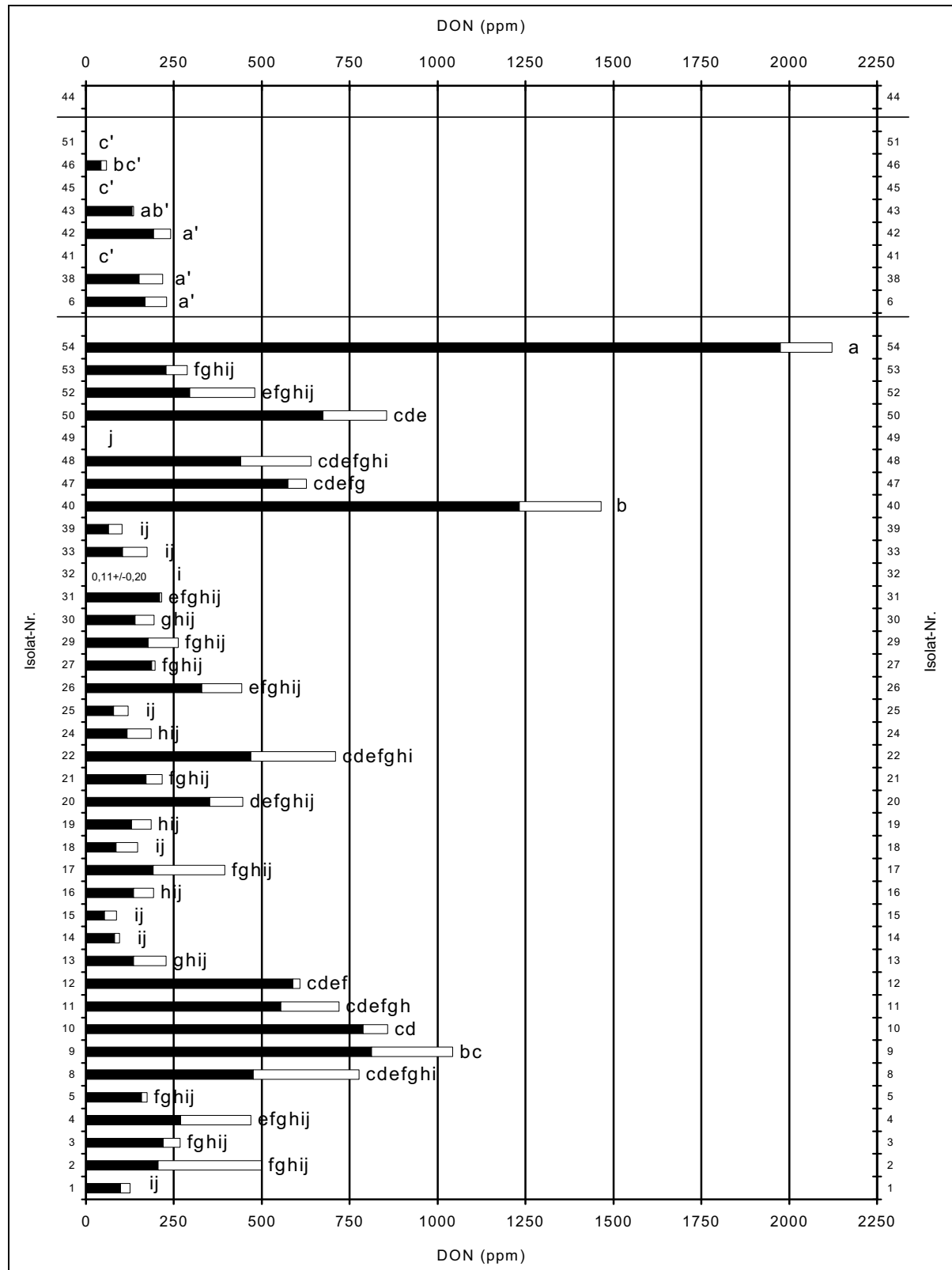


Abbildung 3.16: DON-Bildung der 47 *Fusarium*-Isolate nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*. Mittelwert aus drei WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Bei Isolat 16 nur zwei WDH. *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=438,8$, $LSD'=104,9$).

Bei den Misch-Isolaten zeigte abgesehen von den nicht DON bildenden Isolaten 41 und 45 nur Isolat 46 signifikante Unterschiede, und zwar zu den Isolaten 6, 38, 42 und 43, die stärkere DON-Bildner waren.

3.3.2.2 Bildung von ADON (Abb. 3.17)

Die ADON-Produktion reichte von 1,2 (Isolat 32) bis 1139 ppm (Misch-Isolat 42). Für die *F. graminearum*-Isolate war 845 ppm der Höchstwert (Isolat 50).

Bei vier der 47 Isolate konnte kein ADON nachgewiesen werden (Isolate 41, 44, 45, 51). Bei allen *F. graminearum*-Isolaten ist ADON vorhanden. Elf der 43 verbleibenden Isolate bildeten weniger als 100 ppm ADON (hierunter kein Misch-Isolat), 15 Isolate zwischen 100 und 250 ppm, davon drei Misch-Isolate. Zehn weitere Isolate (alles *F. graminearum*) produzierten zwischen 250 und 500 ppm ADON. Von den verbleibenden sieben Isolaten bildeten sechs zwischen 500 und 1000 ppm ADON (davon ein Misch-Isolat), während Isolat 42 als einziges über 1000 ppm ADON produzierte. Die beiden Höchstwerte werden von Misch-Isolaten repräsentiert. Der Mittelwert der ADON-Bildung über alle ADON bildenden Isolate betrug 269 ppm und lag somit unter dem Level der DON-Bildung.

Aufgrund großer Standardabweichungen traten bei den *F. graminearum*-Isolaten relativ wenige signifikante Unterschiede auf. Auch Isolat 50 (mit dem Maximalwert) unterschied sich nur von 25 der 38 übrigen *F. graminearum*-Isolate signifikant. Die Misch-Isolate zeigen eine sehr große Spannbreite hinsichtlich der ADON-Produktion. Die Isolate 42 (1139 ppm) und 43 (952 ppm) unterschieden sich signifikant von allen anderen sechs Misch-Isolaten.

3.3.2.3 Bildung von NIV (Abb. 3.18)

Bei den *F. graminearum*-Isolaten war keine NIV-Bildung nachweisbar. Nur bei drei Isolaten konnte NIV nachgewiesen werden. Isolat 41 bildete 3,4 ppm, Isolat 45 17,0 ppm und Isolat 44 13,7 ppm (*F. culmorum*) NIV, was einem Mittelwert von 11,4 ppm für die NIV-Bildner entsprach. Das Niveau der NIV-Bildung lag somit sehr deutlich unter dem von DON und ADON. Die beiden NIV bildenden Misch-Isolate unterschieden sich in Ihrer NIV-Bildung signifikant. Zu beachten ist die für NIV relativ niedrige Wiederfindungsrate (3.1.2.3.1).

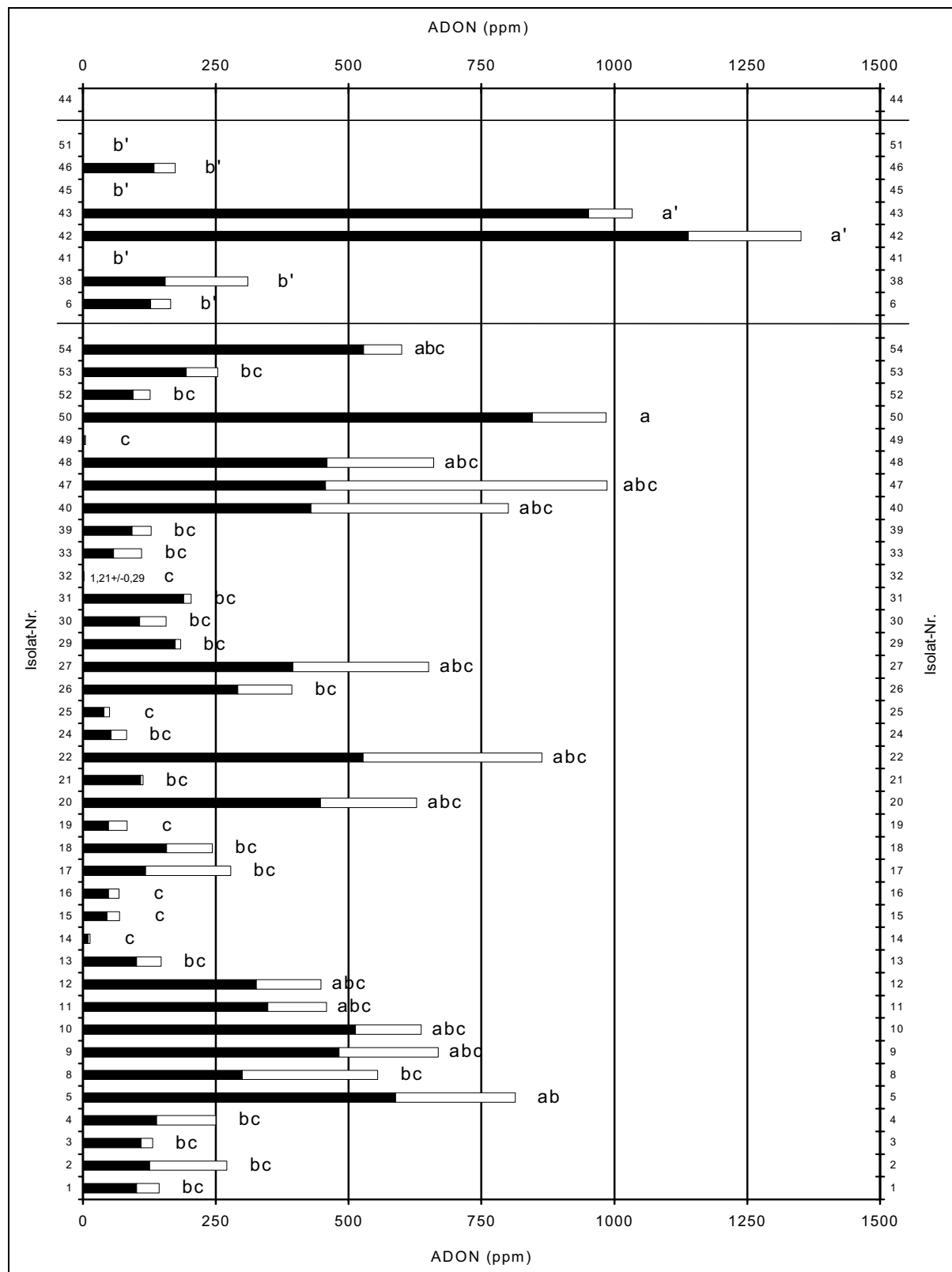


Abbildung 3.17: ADON-Bildung der 47 *Fusarium*-Isolate nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*. Mittelwert aus drei WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Bei Isolat 16 nur zwei WDH. *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=535,5$, $LSD'=281,3$).

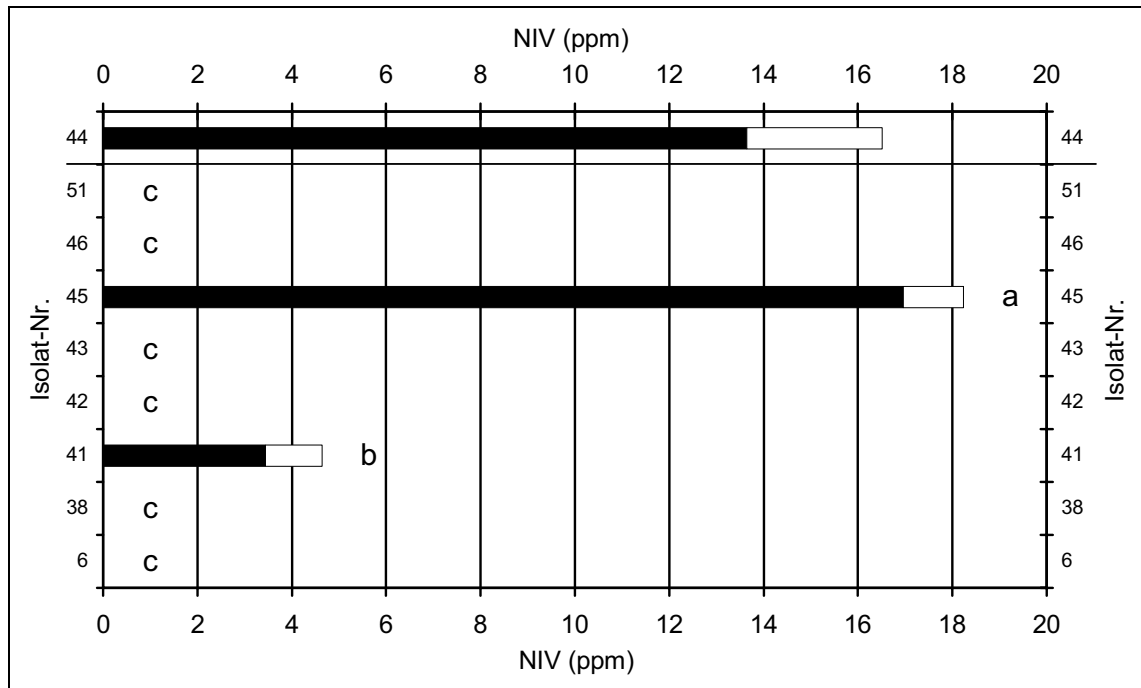


Abbildung 3.18: NIV-Bildung nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*. Mittelwert aus drei WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Misch-Isolate im unteren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=1,76$).

3.3.2.4 Bildung von ANIV (Abb. 3.19)

Bei den *F. graminearum*-Isolaten war auch keine ANIV-Bildung nachweisbar. ANIV wurde in den drei Isolaten nachgewiesen, die auch NIV bildeten. Isolat 41 bildete 47,9 ppm, Isolat 45 11,5 ppm und Isolat 44 13,1 ppm (*F. culmorum*) ANIV, was einem Mittelwert von 24,2 ppm für die ANIV-Bildner entsprach. Das Niveau der ANIV-Bildung lag somit wie auch schon das der NIV-Bildung unter dem von DON und ADON. Die beiden ANIV bildenden Misch-Isolate unterschieden sich in Ihrer ANIV-Bildung signifikant.

3.3.2.5 Bildung von ZON (Abb. 3.20)

Die ZON-Produktion reichte von 0,69 (Isolat 11) bis 103 ppm (Isolat 16). Zu beachten ist bei den ZON-Werten die niedrige Wiederfindungsrate (3.1.2.3.1).

Nur bei einem Isolat konnte kein ZON nachgewiesen werden (Isolat 40). Elf der 46 verbleibenden Isolate bildeten weniger als 5 ppm ZON (darunter das *F. culmorum*-Isolat und ein Misch-Isolat), 17 Isolate zwischen 5 und 20 ppm (davon vier Misch-Isolate). Hier liegt

der Schwerpunkt in der ZON-Bildungs-Quantität. Zehn weitere Isolate produzierten zwischen 20 und 40 ppm ZON (davon zwei Misch-Isolate). Von den verbleibenden acht Isolaten bildeten sechs zwischen 40 und 80 ppm ZON (davon ein Misch-Isolat (Isolat 41; mit 63,5 ppm der Maximalwert der Misch-Isolate)), während zwei Isolate über 80 ppm ZON produzierten (Isolat 53 84,8 ppm und Isolat 16 103 ppm). Der Mittelwert der ZON-Bildung über alle ZON bildenden Isolate betrug 22,9 ppm.

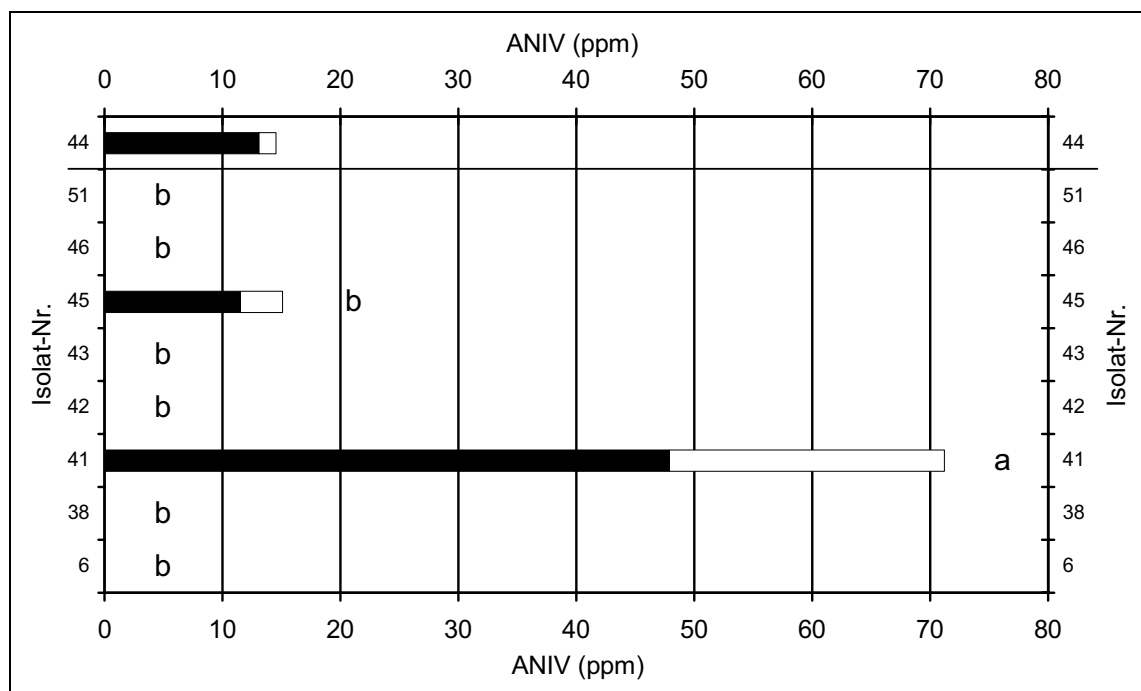


Abbildung 3.19: ANIV-Bildung nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*. Mittelwert aus drei WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Misch-Isolate im unteren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=23,6$).

Für die *F. graminearum*-Isolate traten relativ wenige signifikante Unterschiede für die ZON-Bildung auf. Isolat 16, das am meisten ZON bildete, unterschied sich von allen anderen *F. graminearum*-Isolaten außer den Isolaten 19, 20, 48 und 53 signifikant. Bei den Misch-Isolaten unterschied sich Isolat 41 signifikant von allen übrigen.

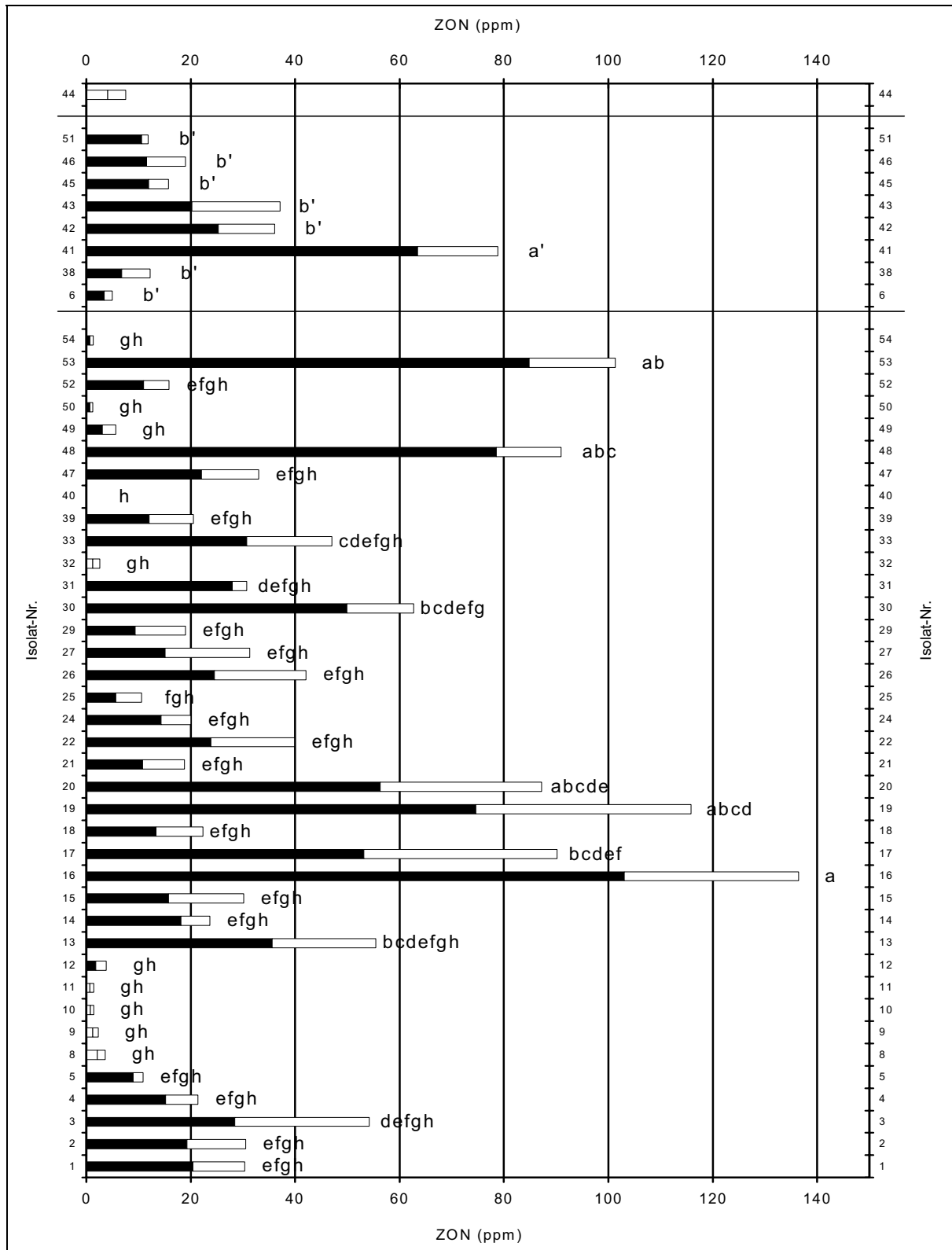


Abbildung 3.20: ZON-Bildung der 47 *Fusarium*-Isolate nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*. Mittelwert aus drei WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Bei Isolat 16 nur zwei WDH. *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=49,4$, $LSD'=29,7$). Mittelwerte als weißer Balken = weniger als 5 ppm (siehe 2.9.5).

3.3.2.6 Zusammenfassende Darstellung aller untersuchten Toxine (Abb. 3.21)

Abb. 3.21 bietet einen Überblick über die Toxin-Profile der verschiedenen Isolate. Die Isolate sind auch in dieser Abbildung nach taxonomischer Einordnung getrennt dargestellt. Innerhalb der Gruppen wurde nach aufsteigender DON-Bildung geordnet.

Grundsätzlich bildeten alle Isolate, die DON bildeten, auch ADON. Außer den Isolaten 36 und 49 bildeten alle Isolate, die ADON bildeten, andersherum auch DON. Bei den Isolaten 36 und 49 handelte es sich zudem um dasselbe Ursprungs-Isolat, das aber von zwei verschiedenen Quellen zur Verfügung gestellt wurde (siehe Anhang A.6). Also bestand eine enge qualitative Korrelation zwischen der Bildung von DON und ADON. Andererseits waren NIV oder ANIV bei Isolaten, die DON oder ADON bildeten, nicht eindeutig nachweisbar.

Bei allen Isolaten, die DON oder ADON bildeten, handelte es sich um *Fusarium graminearum*-Isolate, oder aber um Misch-Isolate mit vorherrschendem *F. graminearum*-Anteil. Nur eines dieser Isolate hat einen dominierenden *F. culmorum*-Anteil (Isolat 46, siehe 3.2.2). Auffällig ist die relativ hohe ADON-Bildung der Isolate 42 und 43, bei denen es sich um Misch-Isolate mit dominierendem *F. graminearum*-Anteil handelt.

Bei allen Isolaten, bei denen NIV nachgewiesen werden konnte (Isolate 41, 44, 45) konnte auch ANIV nachgewiesen werden. Ein Nachweis von DON oder ADON war hier allerdings nicht möglich. Also scheint zumindest für diese drei Isolate eine enge qualitative Korrelation zwischen der Bildung von NIV und ANIV zu bestehen. Kein reines *F. graminearum*-Isolat konnte als NIV-Bildner identifiziert werden.

Bei Isolat 41 handelte es sich um ein mit *F. culmorum* verunreinigtes *F. graminearum*-Isolat, bei Isolat 44 um ein reines *F. culmorum*-Isolat und bei Isolat 45 um ein mit *F. graminearum* verunreinigtes *F. culmorum*-Isolat (3.2.2).

Relativ schwache Detektor-Signale mit derselben Retentions-Zeit wie NIV oder ANIV waren bei DON-Bildnern weit verbreitet, konnten aber nach den vorhandenen Kriterien (2.9.7.1) nicht eindeutig identifiziert werden. Als Beispiele hierfür ist ein potentiell ANIV-Signal für die Isolate 40, 50 und 54 zu nennen (siehe Diskussion).

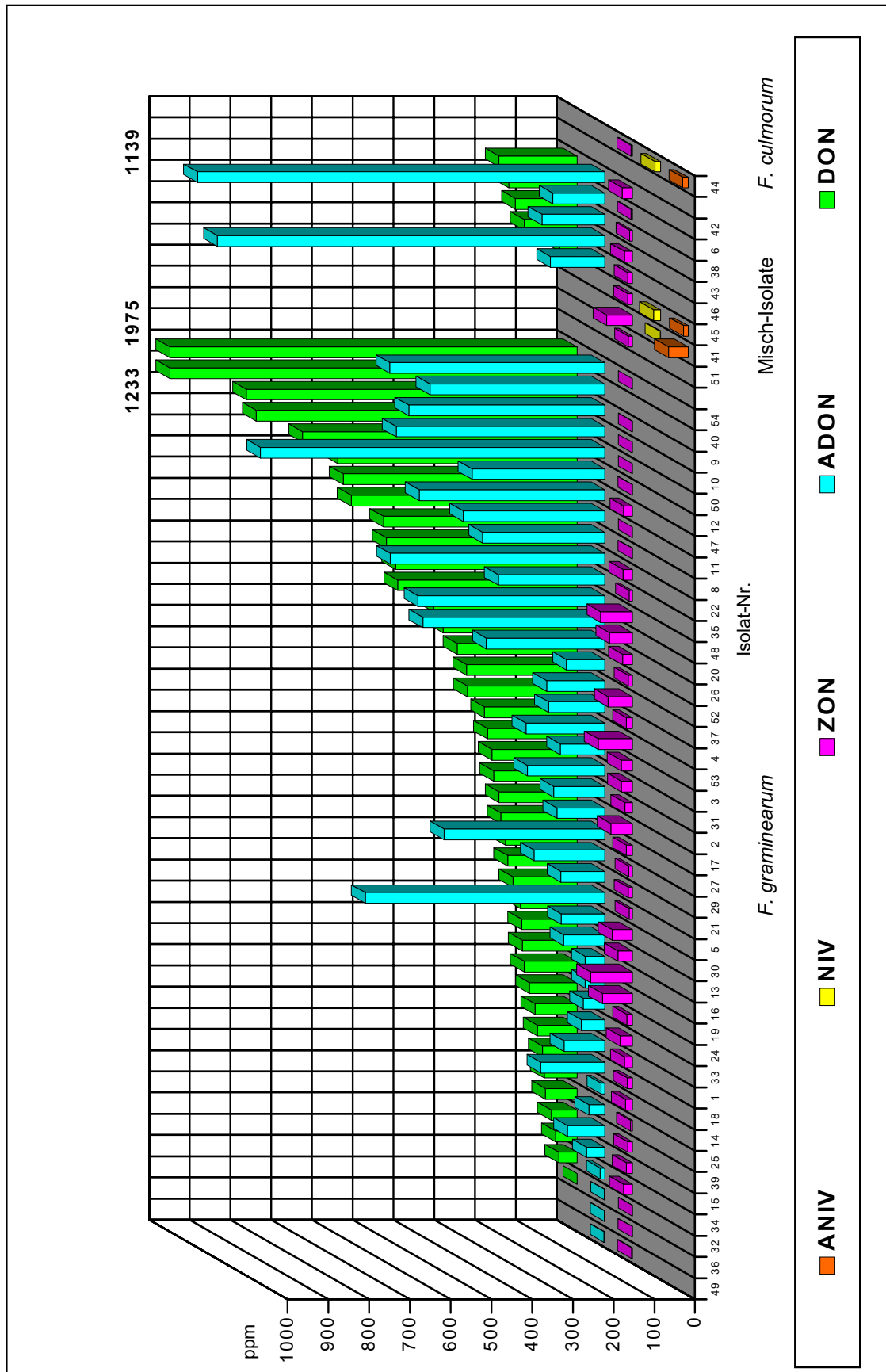


Abbildung 3.21: Zusammenfassende Darstellung der Toxinbildung der 51 *Fusarium*-Isolate nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*.

Die Isolate sind nach taxonomischer Einordnung gruppiert: links *F. graminearum*, rechts Misch-Isolate, ganz rechts *F. culmorum*. Innerhalb der Gruppen sind die Isolate nach aufsteigender DON-Bildung geordnet.

ZON war bei allen Isolaten außer Isolat 40 nachweisbar. Es bestand keine Beziehung zur Bildung von DON, ADON, NIV oder ANIV.

Eine Ausnahme bildete Isolat 51, das keine Trichothecene, wohl aber ZON produzierte. Bei diesem Isolat handelte es sich um ein *Fusarium avenaceum*-Isolat mit Verunreinigungen von *Fusarium graminearum* und vermutlich einer weiteren *Fusarium*-Art.

Als stärkste Toxinbildner können die Isolate 42, 43 und 50 (ADON dominiert) und die Isolate 10, 9, 40 und 54 (DON dominiert) genannt werden.

3.3.2.7 Korrelation zwischen DON und ADON

Auch auf quantitativer Ebene war eine Korrelation zwischen DON und ADON erkennbar, wie die lineare Regression für die 38 *F. graminearum*-Isolate in Abb. 3.22 zeigt. Die Berechnung der Pearson-Korrelation zeigte, dass es sich hier um eine höchst signifikante Abhängigkeit handelte ($R = 0,66$). Besonders hervorzuheben sind hier die Isolate 5 und 27, die diese Tendenz durch eine relativ starke ADON-Bildung durchbrachen (Abb. 3.21).

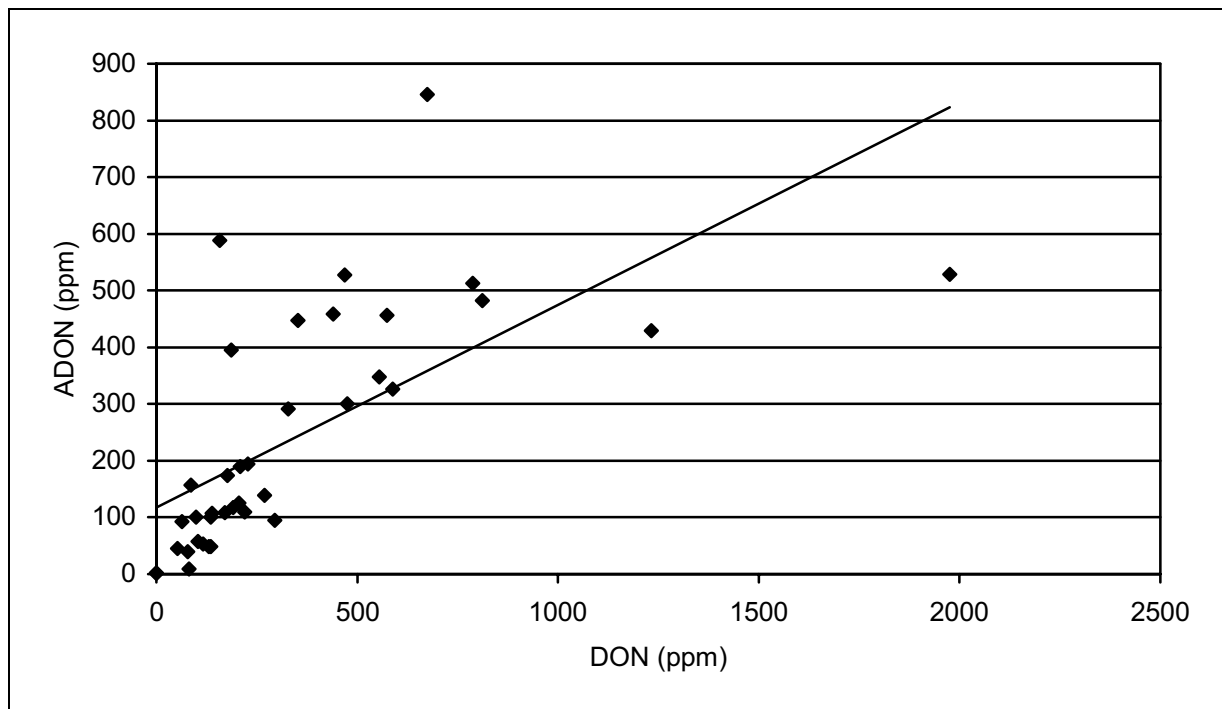


Abbildung 3.22: Korrelation zwischen der DON- und ADON-Produktion der 38 untersuchten *F. graminearum*-Isolate auf Reis *in vitro* nach 21 Tagen.

Ohne die Werte-Paare dieser zwei Isolate ergab sich für den Korrelationskoeffizienten ein Wert von $R = 0,73$.

Für die acht Misch-Isolate ist keine signifikante Korrelation zwischen DON und ADON-Produktion zu erkennen (Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,069$). Besonders die Isolate 42 und 43 bilden überdurchschnittlich viel ADON. Ohne die Wertepaare dieser beiden Isolate ist eine signifikante Abhängigkeit zwischen DON- und ADON-Bildung vorhanden ($R = 0,84$, $p = 0,035$).

Auf eine quantitative Korrelierung der Daten zur Bildung von NIV und ANIV wurde aufgrund der geringen Anzahl NIV bildender Isolate verzichtet.

Die ZON-Bildung zeigte keine signifikante Korrelation zur Bildung von DON oder ADON ($p = 0,092$ bis $p = 0,908$).

3.3.3 Chromatogramme zur Toxinbildung *in vitro*

Hier werden einige charakteristische Chromatogramme der beobachteten Chemotypen beispielhaft dargestellt. Abb. 3.23 zeigt neben der nicht fermentierten Kontrolle (Nr. 7) und dem Standard-Gemisch (Nr. 8) die Chromatogramme eines relativ schwachen DON-Bildners (Isolat 34, *F. graminearum*, Nr. 1), eines relativ starken DON-Bildners (Isolat 9, *F. graminearum*, Nr. 2), zweier NIV-Bildner (Isolat 41, *F. graminearum* mit vergleichsweise schwacher Verunreinigung von *F. culmorum* (Nr. 4) und Isolat 44, *F. culmorum*, Nr. 5) und zweier Isolate, bei denen keine oder nur relativ geringe Mengen der analysierten Trichothecene nachgewiesen werden konnten (Isolat 36, *F. graminearum* (Nr. 3) und Isolat 51, *F. avenaceum* (Nr. 6) mit Verunreinigung durch *F. graminearum*).

Trotz der Chemotypenbildung war bei allen Isolaten ein einheitliches Grundmuster der Chromatogramme zu erkennen. Besonders deutlich wurde dies an Peaks, die in allen Chromatogrammen auftraten, wenn auch in unterschiedlicher Quantität. Exemplarisch soll hier der Peak erwähnt werden, der in der Kontrolle (Nr. 7) bei 8.87 eluiert und in allen Chromatogrammen der Abb. 3.23 mit einem Kreuz markiert ist. Die Konzentration war in allen Isolaten höher als in der Kontrolle. Der Peak x hingegen konnte nur in den fermentierten Proben sicher nachgewiesen werden. Diese Substanz war beispielsweise bei Isolat 34 regelmäßig anzutreffen, fehlte aber vollständig in anderen (z. B. Isolat 36, Nr. 3).

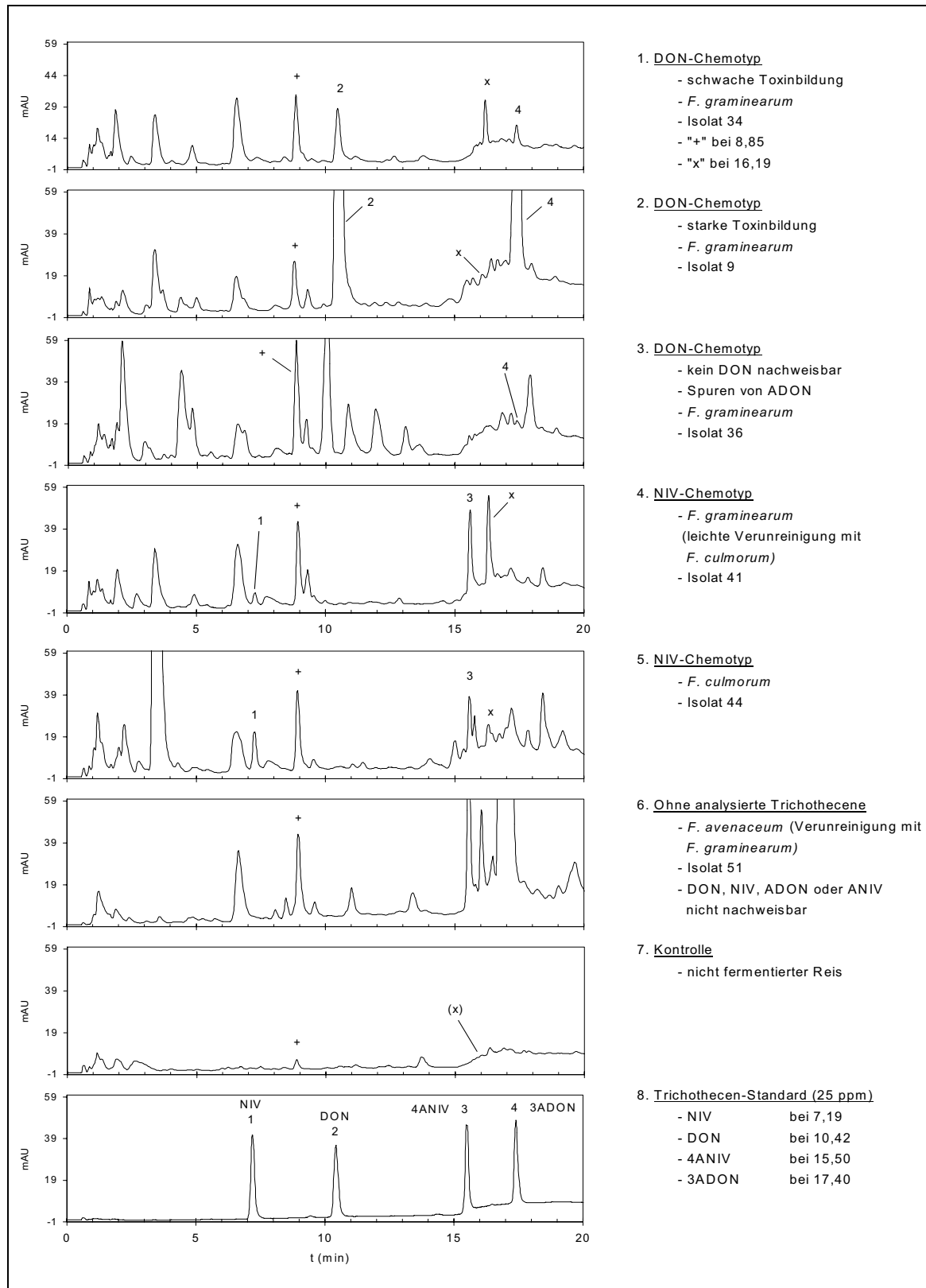


Abbildung 3.23: HPLC-Chromatogramme von Reisproben, die von *Fusarium*-Isolaten verschiedener Chemotypen fermentiert wurden (21 Tage). HPLC-Methode M2 (siehe 2.9.4.2), UV-Detektion bei $\lambda = 220$ nm. Die Peaks 1-4 stellen die benannten Trichothecene dar, der mit "+" bezeichnete Peak einen Störpeak und das mit "x" markierte Signal eine unbekannte Substanz. Die Konzentration der Mykotoxine im Standard (Nr. 8) betrug 25 ppm.

3.4 Ergebnisse des Aggressivitätstests

3.4.1 Einfluss der Sporendichte

Da nicht bei allen Isolaten die gewünschte Sporendichte von 5×10^5 Sporen/ml erreicht werden konnte, wurde getestet, wie groß der Einfluss einer veränderten Sporendichte auf die Ergebnisse des Aggressivitätstests ist. Hierzu wurde der Aggressivitätstest wie beschrieben in zweimaliger Wiederholung mit Isolat 29 (*Fusarium graminearum*) mit vier verschiedenen Sporenkonzentrationen (1×10^4 , 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 Sporen/ml) und einer Kontrolle (0 Sporen/ml) durchgeführt, also insgesamt fünf Varianten. Die Mittelwerte verschiedener Parameter sind in Abb. 3.24 und Abb. 3.25 dargestellt.

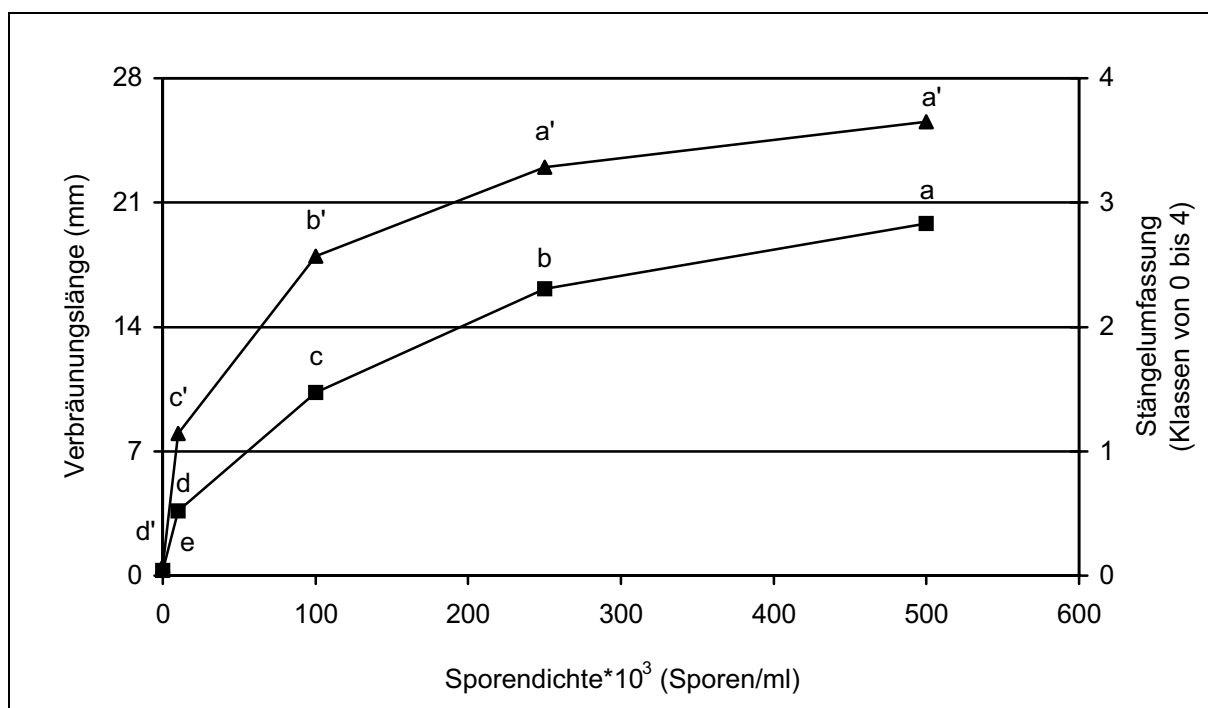


Abbildung 3.24: Länge der Verbräunung in mm (■) und Grad der Verbräunung (▲) in Klassen von 0-4 an der Sprossbasis von Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit Isolat 29 (*F. graminearum*) mit vier verschiedenen Sporendichten im Inokulum nach sieben Tagen in mm. Mittelwerte aus zwei zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Versuchen. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=2,50$ bzw. $LSD=0,42$).

Da zwischen den beiden Wiederholungen dieses Versuchs für alle gemessenen Parameter außer der Befallshäufigkeit (BH) ein Niveau-Unterschied auftrat (signifikante Unterschiede

zwischen den beiden Versuchs-Wiederholungen für vier der fünf Varianten), wurde dieser Einfluss in der statistischen Verrechnung als Blockfaktor berücksichtigt.

Nach sieben Tagen traten für die Verbräunungslänge signifikante Unterschiede zwischen allen getesteten Varianten auf (Abb. 3.24). Die Stängelumfassung unterschied sich für alle Varianten außer die beiden höchsten Sporendichten 5×10^5 und $2,5 \times 10^5$ Sporen/ml signifikant voneinander. Der höchste Wert mit 19,8 mm Verbräunungslänge bei einer Stängelumfassung von 3,65 trat erwartungsgemäß bei der höchsten Sporendichte von 5×10^5 Sporen/ml auf. Der niedrigste Wert (3,7 mm; 1,15) war bei der geringsten Sporendichte von 1×10^4 Sporen/ml vertreten. Die vergleichsweise schwache Symptomausprägung bei der nur mit Wasser behandelten Kontrolle (0,3 mm; 0,08) war auf nur vier vermutlich durch Saprophyten oder sekundär durch *Fusarium* infizierte Einzelpflanzen zurückzuführen.

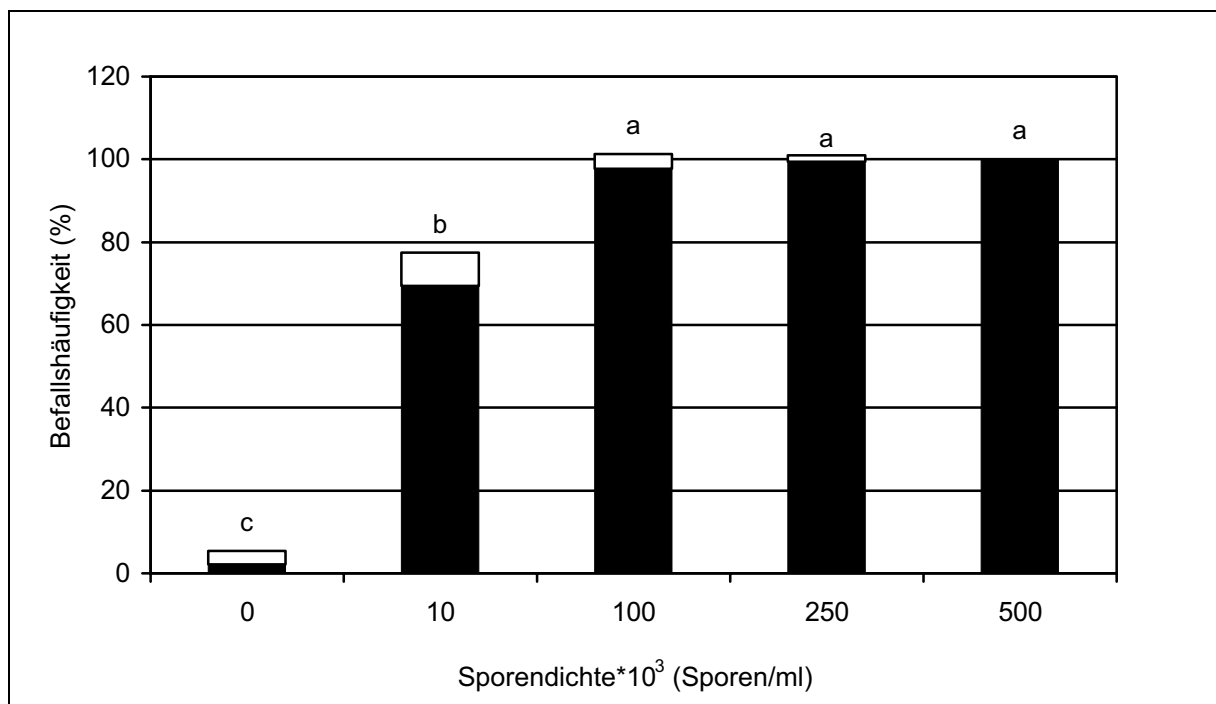


Abbildung 3.25: Befallshäufigkeit (BH) (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit Isolat 29 (*F. graminearum*) mit vier verschiedenen Sporendichten im Inokulum nach sieben Tagen. Mittelwerte aus zwei zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Versuchen (schwarze Balken, n=8) und Standardabweichung (weiße Balken). Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, LSD=6,03).

Ab einer Sporendichte von 1×10^4 Sporen/ml verlief bei signifikant weniger inokulierten Pflanzen die Inokulation erfolgreich (Abb. 3.25). Im Vergleich zu den drei höchsten Sporendichten, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (97 % bis 100 %), lag die Befallshäufigkeit hier nur bei 69,5 %.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei dem Bonitur-Parameter Verbräunungslänge nach sieben Tagen schon ab einer Sporendichte von $2,5 \times 10^5$ Sporen/ml signifikante Unterschiede zur Soll-Konzentration von 5×10^5 Sporen/ml auftraten. Bei den Parametern Stängelumfassung nach sieben Tagen und Befallshäufigkeit war dies erst ab einer Sporendichte von 1×10^5 bzw. 1×10^4 Sporen/ml der Fall.

3.4.2 Symptomausprägung nach sieben Tagen

Wie schon bei den Versuchen zur Toxinbildung in vitro wurden bei der Darstellung dieser Ergebnisse die kontaminierten Isolate 7, 23 und 28 nicht berücksichtigt. Ebenso wurden die Isolate 34, 35, 36 und 37 aus einer gemeinsamen Darstellung ausgelassen, da mit ihnen im Gegensatz zu den übrigen Isolaten eine Wirtspassage durchgeführt worden war. Die Auswirkung einer Wirtspassage auf die Aggressivität dieser Isolate wird getrennt betrachtet (3.6). Die übrigen Isolate wurden nach taxonomischer Einordnung getrennt dargestellt und auch getrennt statistisch verrechnet. Ergebnisse von Isolaten, bei denen der Aggressivitätstest mangels ausreichender Sporulation mit zu geringer Sporendichte durchgeführt worden war, wurden zwar dargestellt (mit "+" markiert), aber nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Statistisch verrechnet wurden also 31 *F. graminearum*-Isolate und 8 Misch-Isolate.

Im folgenden werden also insgesamt 40 *Fusarium*-Isolate (31 *F. graminearum*-, acht Misch-Isolate und ein *F. culmorum*-Isolat) betrachtet, außerdem die sieben nicht statistisch verrechneten *F. graminearum*-Isolate mit zu geringer Sporulation.

Da zwischen den einzelnen Versuchen dieses Experiments Niveau-Unterschiede auftraten, wurde vorerst untersucht, bei welchen der Isolate zwischen der ersten und zweiten Wiederholung dieses Versuchs signifikante Unterschiede auftraten. Dies war für die *F. graminearum*-Isolate bei der Verbräunungslänge für acht von 31, bei der Stängelumfassung für sechs von 31 und bei der Befallshäufigkeit für drei von 31 Isolaten der Fall. Keines der Misch-Isolate war von dieser Tendenz betroffen. Das *F. culmorum*-Isolat zeigte einen signifikanten Einfluss der Wiederholung nur bei der Befallshäufigkeit.

Bei den *F. graminearum*-Isolaten und der Verbräunungslänge war für fünf der acht betroffenen Isolate Signifikanz für diesen Zusammenhang allerdings nicht besonders ausgeprägt (p lag zwischen 0,024 und 0,046).

Eine Varianzanalyse, bei der in einer gemeinsamen Betrachtung aller Isolate (getrennt nach den 31 *F. graminearum*-Isolaten und den acht Misch-Isolaten) die zweifache Wiederholung der einzelnen Isolate als Block definiert wurde, zeigte, dass dieser Wiederholungsfaktor keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Aggressivitätsparameter hatte. Dies galt sowohl für die 31 *F. graminearum*-Isolate als auch für die acht Misch-Isolate. Der deutlichste, aber ebenfalls nicht signifikante Einfluss trat bei der Befallshäufigkeit für die 31 *F. graminearum*-Isolate auf ($p = 0,079$). Die übrigen p-Werte lagen zwischen 0,48 und 0,76.

Daher konnte der Faktor "Wiederholung des Versuchs" in der statistischen Verrechnung ignoriert werden und die insgesamt acht Wiederholungen aus beiden Versuchen für ein Isolat konnten unabhängig davon, welcher Wiederholung sie entstammten, gemeinsam verrechnet werden.

3.4.2.1 Verbräunungslänge

In Abb. 3.26 sind die Werte zur Verbräunungslänge nach sieben Tagen dargestellt. Die Werte variieren von 4,1 (Isolat 51, Misch-Isolat) bis 22,0 mm (Isolat 10, *F. graminearum*).

Nur eines der 40 Isolate lag unter 5 mm (ein Misch-Isolat). Zwei der verbleibenden 39 Isolate lagen zwischen 5 und 10 mm. Neun der weiteren 37 Isolate zeigten eine Verbräunungslänge zwischen 10 und 15 mm. Von diesen waren zwei Misch-Isolate. Von den verbleibenden 28 Isolaten lagen 22 zwischen 15 und 20 mm. Davon waren vier Misch-Isolate. Auch das einzige *F. culmorum*-Isolat (Isolat 44, 16,2 mm) fiel in diese Gruppe. Die restlichen sechs Isolate verursachten eine Verbräunung mit über 20 mm Länge, davon ein Misch-Isolat.

Der quantitative Schwerpunkt in der Symptomausprägung lag zwischen 15 und 20 mm. Dies zeigte sich auch am gemeinsamen Mittelwert für alle Isolate, der bei 15,8 mm lag. Die Misch-Isolate lagen mit 14,4 mm knapp unter diesem Ergebnis, die *F. graminearum*-Isolate mit 16,5 mm darüber.

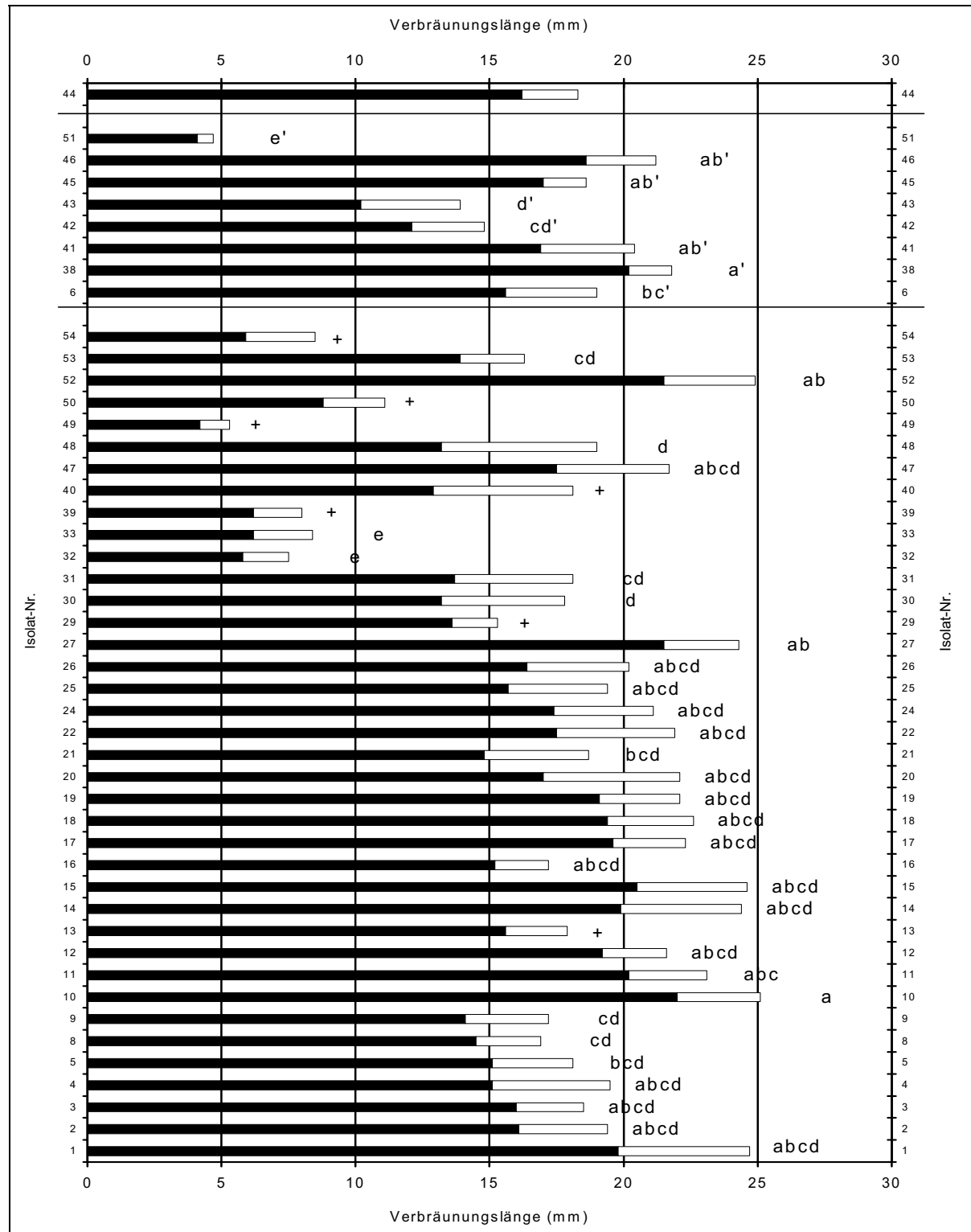


Abbildung 3.26: Länge der Verbräunung an der Sprossbasis von Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit verschiedenen *Fusarium*-Isolaten nach sieben Tagen in mm. Mittelwert aus acht WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Pflanzen ohne Symptome gehen als Nullwerte in den Mittelwert mit ein. *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=6,89$, $LSD'=4,19$). + Isolate, die aufgrund zu geringer Sporendichte im Inokulum nicht statistisch mit verrechnet wurden.

Aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte traten nur relativ wenige signifikante Unterschiede auf. Bei den *F. graminearum*-Isolaten unterschieden sich die Isolate 32 und 33 signifikant von allen anderen, bei den Misch-Isolaten Isolat 51 (4,1 mm).

Die sieben *F. graminearum*-Isolate mit zu geringer Sporulation zeigten insgesamt ein nur relativ niedriges Schädigungsniveau (Mittelwert 9,6 mm). Vier der Isolate lagen unter 10 mm, nur zwei darüber.

3.4.2.2 Stängelumfassung der Verbräunung

In Abbildung 3.27 sind die Werte zur Stängelumfassung der Verbräunung nach sieben Tagen dargestellt. Die Werte variierten von 1,5 (Isolat 33, *F. graminearum*) bis 3,9 (Isolat 52, *F. graminearum*).

Drei der 40 Isolate lagen unter 2,0 (Isolate 32 und 33 als *F. graminearum*, Isolat 51 als Misch-Isolat), ein Misch-Isolat lag zwischen 2,0 und 2,5 (Isolat 43). Zehn der verbleibenden 36 Isolate lagen zwischen 2,5 und 3, davon zwei Misch-Isolate. 16 der weiteren 26 Isolate zeigten eine Stängelumfassung der Verbräunung zwischen 3,0 und 3,5. Von diesen waren zwei Misch-Isolate. Auch das *F. culmorum* Isolat (Isolat 44) war hier mit 3,3 vertreten. Die restlichen zehn Isolate lagen über einem Wert von 3,5, davon zwei Misch-Isolate.

Der quantitative Schwerpunkt in der Symptomausprägung lag bei *F. graminearum* zwischen 3,0 und 3,5, bei den Misch-Isolaten eher zwischen 2,5 und 3,5. Dies zeigte sich auch am gemeinsamen Mittelwert für alle Isolate, der bei 3,1 lag. Wiederum lagen die Misch-Isolate mit 2,9 unter diesem Ergebnis, die *F. graminearum*-Isolate hingegen lagen mit 3,1 im Bereich des Mittelwerts.

Aufgrund der relativ großen Streuung der Einzelwerte traten wie auch schon für die Verbräunungslänge nur relativ wenige signifikante Unterschiede auf. Bei den *F. graminearum*-Isolaten unterschieden sich wiederum nur die Isolate 32 und 33 signifikant von allen anderen, bei den Misch-Isolaten Isolat 51.

Die sieben *F. graminearum*-Isolate mit zu geringer Sporulation zeigten insgesamt ein niedrigeres Schädigungsniveau (Mittelwert 2,3). Vier der Isolate lagen unter 2,5, eines über 3,0.

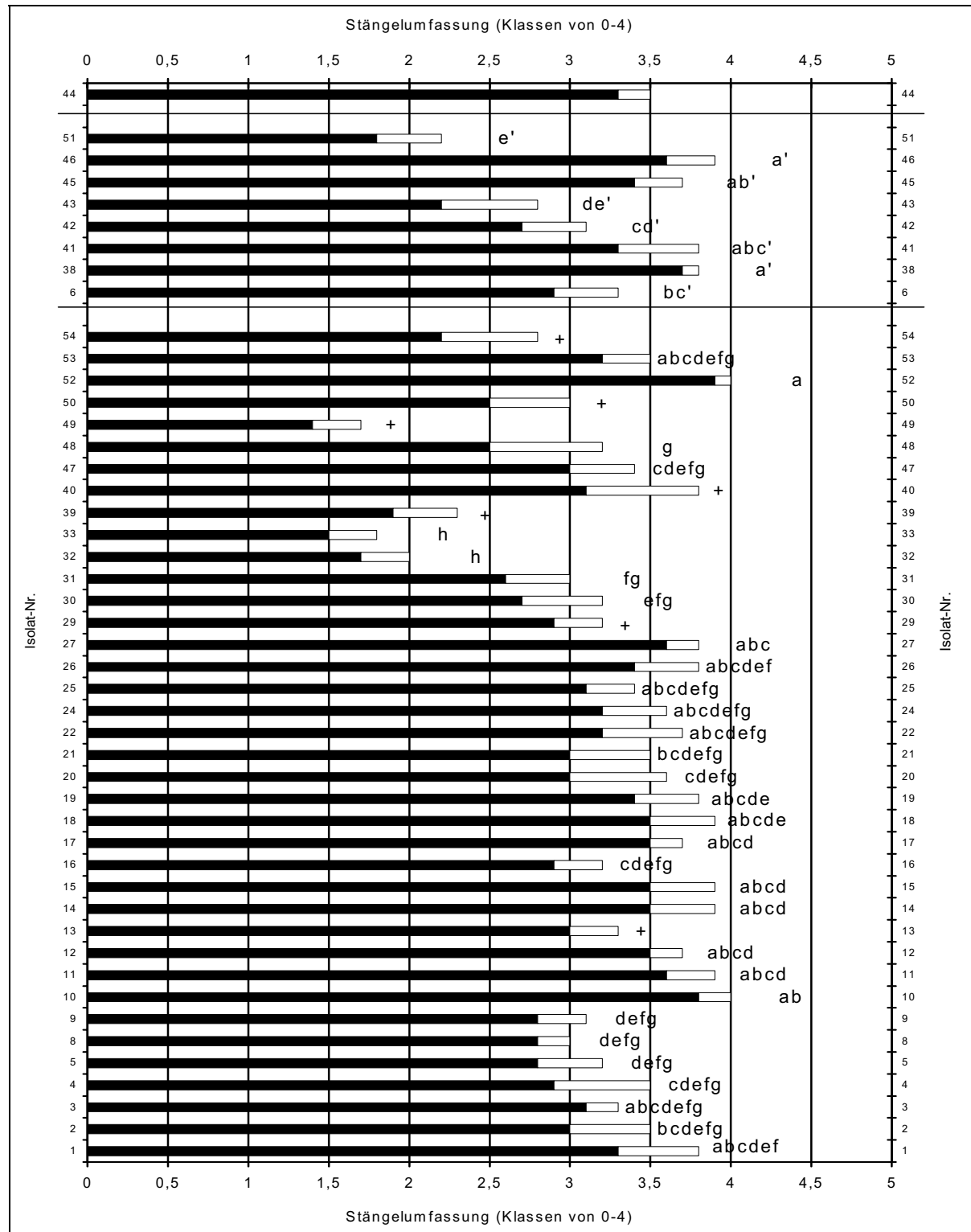


Abbildung 3.27: Stängelumfassung der Verbräunung an der Sprossbasis von Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit verschiedenen *Fusarium*-Isolaten nach sieben Tagen in Klassen von 0 - 4. Mittelwert aus acht WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Pflanzen ohne Symptome gehen als Nullwerte in den Mittelwert mit ein. *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=0,76$, $LSD'=0,61$). + = Isolate, die aufgrund zu geringer Sporendichte im Inokulum nicht statistisch mit verrechnet wurden.

3.4.2.3 Befallshäufigkeit

Bei der Befallshäufigkeit bietet sich ein anderes Bild als bei den beiden vorigen Größen. Die Mittelwerte lagen alle enger zusammen (Abb. 3.28).

Die Werte variierten von 77,2 (Isolat 33, *F. graminearum*) bis 100 % (Isolate 10, 11, 52, *F. graminearum*).

Zwei der 40 Isolate lagen unter 80 % (Isolate 33 als *F. graminearum*, Isolat 43 als Misch-Isolat). Nur ein *F. graminearum*-Isolat lag zwischen 80 und 90 % (Isolat 48). Zehn der verbleibenden 37 Isolate lagen zwischen 90 und 95 %, davon drei Misch-Isolate. Dreizehn der weiteren 27 Isolate zeigten eine Befallshäufigkeit zwischen 95 und 97,5 %. Von diesen waren zwei Misch-Isolate. Auch das *F. culmorum* Isolat (Isolat 44) war hier mit 97,4 % vertreten. Die restlichen 14 Isolate lagen über einem Wert von 97,5 %, davon zwei Misch-Isolate.

Der quantitative Schwerpunkt in der Symptomausprägung lag generell über 95 %. Dies zeigte sich auch am gemeinsamen Mittelwert für alle Isolate, der bei 95,7 % lag. Wiederum lagen die Misch-Isolate mit 94,2 % unter diesem Ergebnis, die *F. graminearum*-Isolate hingegen lagen mit 96,4 % über dem gemeinsamen Mittelwert.

Aufgrund der relativ großen Streuung der Einzelwerte bei vergleichsweise eng liegenden Mittelwerten traten bei der Befallshäufigkeit weniger signifikante Unterschiede auf als bei der Verbräunungslänge oder der Stängelumfassung der Verbräunung. Bei den *F. graminearum*-Isolaten unterschied sich Isolat 33 signifikant von allen Isolaten außer Isolat 48. Zwischen Isolat 48 und allen anderen Isolaten außer Isolat 32 und 33 bestanden signifikante Unterschiede. Bei den Misch-Isolaten unterschied sich nur Isolat 43 signifikant von allen anderen.

Die sieben *F. graminearum*-Isolate mit zu geringer Sporulation zeigten nicht notwendigerweise eine geringe Befallshäufigkeit. Ein Isolat lag unter 80 %, eines zwischen 80 und 90 %, zwei weitere zwischen 90 und 95 %, ein weiteres zwischen 95 und 97,5 %. Zwei der Isolate verursachten eine Befallshäufigkeit von über 99 % (Isolate 13 und 40). Der Mittelwert lag mit 88,1 % vergleichsweise niedrig.

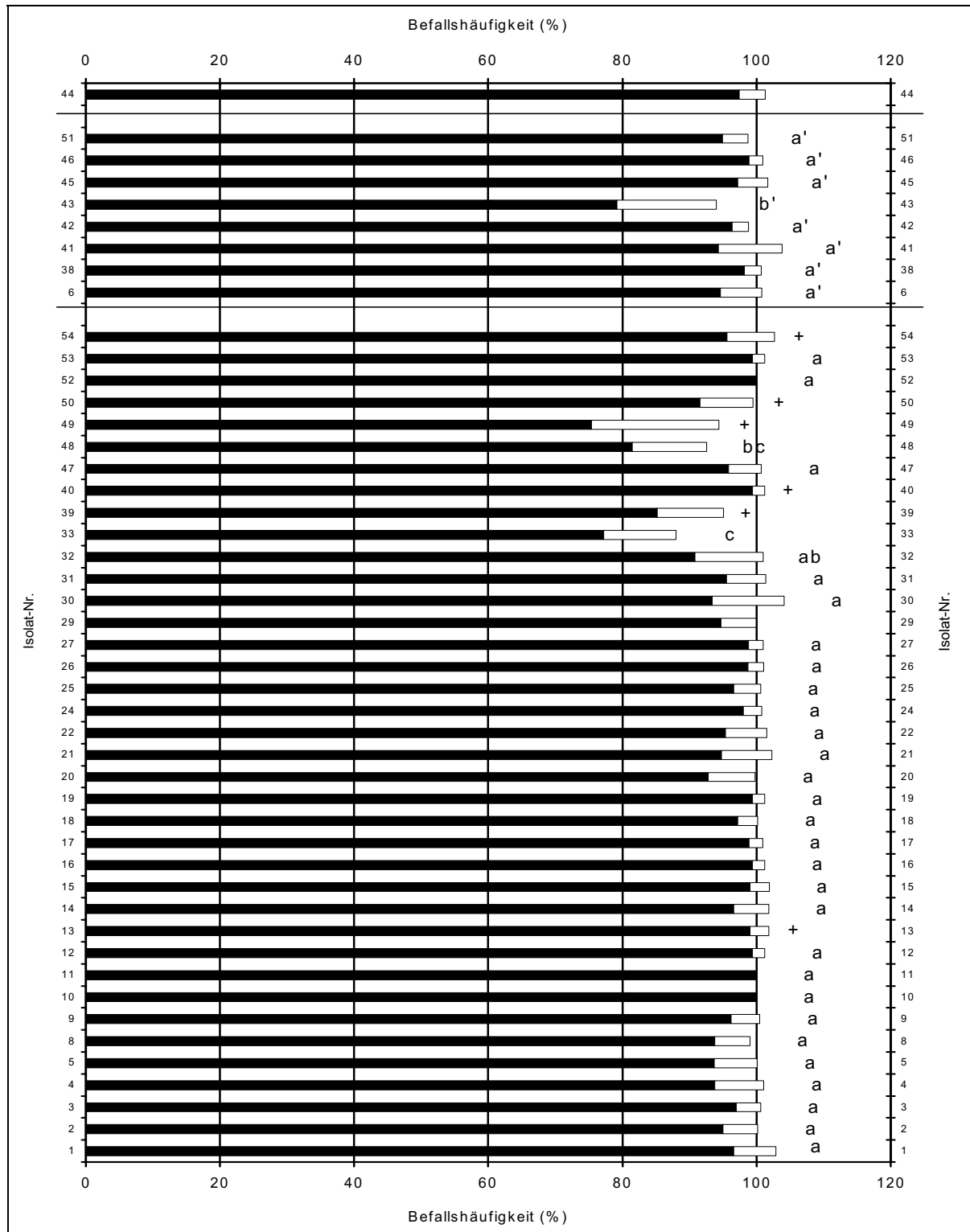


Abbildung 3.28: Befallshäufigkeit von Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit verschiedenen *Fusarium*-Isolaten nach sieben Tagen in Prozent. Mittelwert aus acht WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=10,7$, $LSD'=11,1$). + = Isolate, die aufgrund zu geringer Sporendichte im Inokulum nicht statistisch mit verrechnet wurden.

3.4.2.4 Zusammenfassende Betrachtung der Schädigung nach sieben Tagen

Insgesamt zeigten die untersuchten Isolate hinsichtlich der Symptome nach sieben Tagen ein relativ homogenes Bild. Nur relativ wenige Isolate ragten durch eine besonders niedrige oder hohe Aggressivität heraus.

Bei *F. graminearum* zeigten die Isolate 32, 33, 48, 30 und 31 die niedrigsten Symptomausprägungen. Da in dieser Darstellung die Pflanzen ohne Symptome als Nullwerte in den Mittelwert eingehen, kann dieser Eindruck durch die relativ geringe Befallshäufigkeit bei den Isolaten 48 und 33 relativiert werden, nicht aber bei den Isolaten 30, 31 und 32, die sich von den meisten anderen Isolaten in ihrer Befallshäufigkeit nicht signifikant unterscheiden. Zur Verdeutlichung sind die Ergebnisse für die Verbräunungslänge im Anhang (A.9) in anderer Form dargestellt. Dort wurden bei der Bildung des Mittelwertes nur die Weizenpflanzen berücksichtigt, die eine Symptomausprägung zeigten. Die Nullwerte (Pflanzen ohne Symptome) wurden dort bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt. Die deutlichsten Symptome zeigten die Isolate 10, 27 und 52 mit relativ hohen Befallshäufigkeiten.

Bei den Misch-Isolaten zeigte Isolat 51 die signifikant geringsten Symptome für beide Bonitur-Parameter. Die Befallshäufigkeit dieses Isolats lag mit 94,9 % aber nur um 0,8 % niedriger als der Mittelwert. Bei Isolat 51 lagen im Inokulum fast keine *F. graminearum*-Sporen vor. Die signifikant geringste Befallshäufigkeit zeigte Isolat 43, das seinerseits die zweit-schwächsten Symptome verursacht. Isolat 38 war am aggressivsten, aber hier bestanden nur zu relativ wenigen Isolaten signifikante Unterschiede.

Im Mittelwert waren die *F. graminearum*-Isolate etwas aggressiver und zeigten eine höhere Befallshäufigkeit als die Misch-Isolate. Das *F. culmorum*-Isolat war von der Aggressivität und Befallshäufigkeit her etwas überdurchschnittlich.

3.4.2.5 Korrelation zwischen den Befallsparametern

Die Ergebnisse zeigen, dass ein enger Zusammenhang zwischen diesen drei erhobenen Aggressivitäts-Parametern sieben Tage nach Inokulation besteht.

Die lineare Regression für die 31 *F. graminearum*-Isolate in Abb. 3.29 zeigt den engen Zusammenhang zwischen der Verbräunungslänge an der Sprossbasis und dem Ausmaß der Stängelumfassung dieses Symptoms.

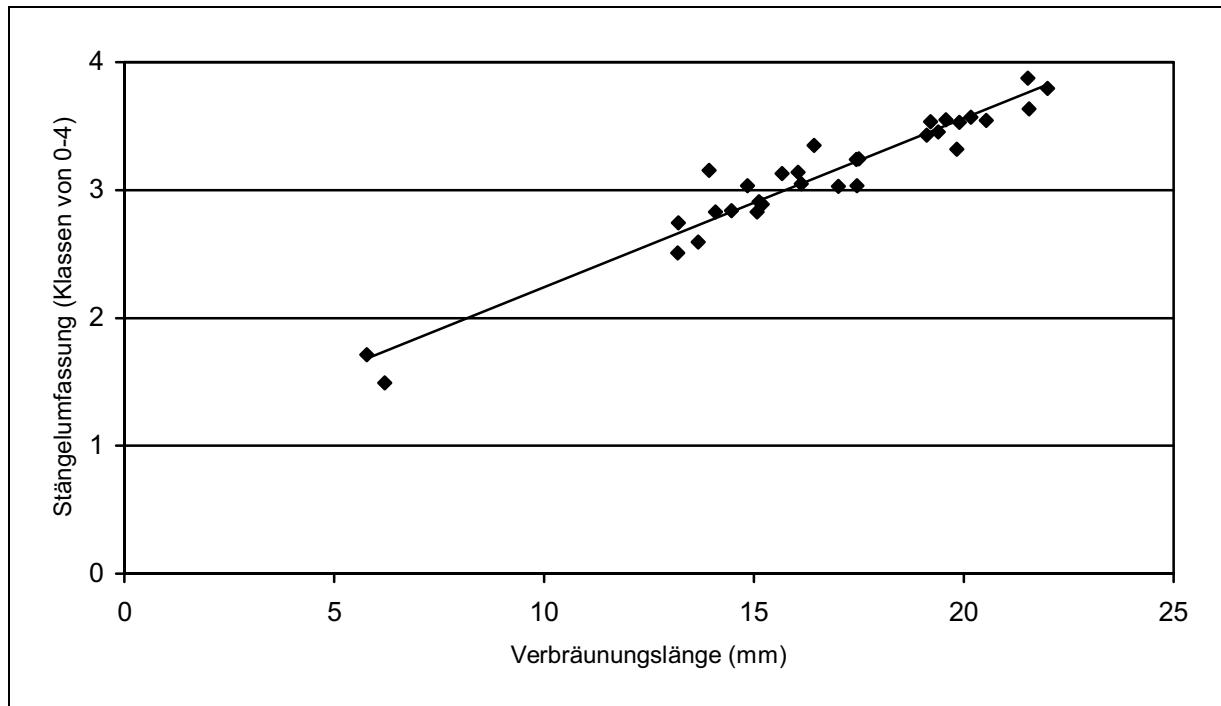


Abbildung 3.29: Korrelation zwischen der Verbräunungslänge und der Stängelumfassung der Verbräunung an Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit 31 *F. graminearum*-Isolaten nach sieben Tagen (lineare Regression). Pflanzen ohne Symptome gehen als Nullwerte in den Mittelwert mit ein.

Der Korrelations-Test nach Pearson macht deutlich, dass dieser Zusammenhang höchst signifikant ist ($R = 0,96$, $p < 0,001$). Außerdem bestehen höchst signifikante Zusammenhänge zwischen Verbräunungslänge und Befallshäufigkeit und Stängelumfassung und Befallshäufigkeit eines Isolats.

Bei den acht untersuchten Misch-Isolaten sind diese Zusammenhänge auch zu erkennen, aber nicht so deutlich wie bei den 31 *F. graminearum*-Isolaten. Der Zusammenhang zwischen Verbräunungslänge und Stängelumfassung war hier hoch signifikant. Auch zwischen der Stängelumfassung und der Befallshäufigkeit bestand eine signifikante Beziehung. Nur die Korrelation zwischen Verbräunungslänge und Befallshäufigkeit bewegte sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 7,8 % relativ knapp unter dem schwächsten Signifikanz-Niveau.

In dieser Berechnung wurden für die Verbräunungslänge und die Stängelumfassung die Nullwerte (Pflanzen ohne Symptome) bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt, da mit diesen Nullwerten zugleich eine Information über die Befallshäufigkeit in den Mittelwert für die anderen Parameter einfließen würde. Da hier aber ein möglicher Zusammenhang zwischen

Misch-Isolate (n=8):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	DON	0,67	-0,32	0,74*	0,57	0,10	-0,04	-0,19	0,14	0,01
2	ADON		0,05	0,99***	0,94***	-0,29	-0,37	-0,52	-0,22	-0,27
3	ZON			0,02	0,38	0,06	0,08	-0,14	0,09	0,13
4	ADON+DON+3xNIV+ANIV				0,94***	-0,23	-0,32	-0,49	-0,16	-0,22
5	DON+ADON+3xNIV+ANIV+10xZON					-0,19	-0,27	-0,51	-0,12	-0,16
6	Verbräunungslänge						0,97***	0,44	0,99***	0,99***
7	Stängelumfassung							0,58	0,94***	0,97***
8	Befallshäufigkeit								0,31	0,38
9	Verbräunungslänge (ohne Nullwerte)									0,98***
10	Stängelumfassung (ohne Nullwerte)									

Die sieben weiteren bei der Toxinbildung (3.3.2) betrachteten *F. graminearum*-Isolate konnten in dieser gemeinsamen Tabelle nicht berücksichtigt werden, da wegen mangelnder Sporulation die Ergebnisse dieser Isolate nicht mit denen der anderen vergleichbar waren. Auf eine Korrelation mit den Parametern NIV- und ANIV-Bildung wurde verzichtet, da diese Toxine nur von zwei der acht Misch-Isolate gebildet wurden. NIV und ANIV fließen nur in die Summenwerte 4 und 5 mit ein.

Die Parameter 1 bis 5 charakterisieren Eigenschaften zur Toxinbildung, die Parameter 6-10 sind Aggressivitäts-Parameter. Der Parameter 4 ist der Summenwert aller Trichothecene. Parameter 5 stellt die Summe aller Mykotoxine (Trichothecene und ZON) dar. Eine solche Betrachtung erschien sinnvoll, da im biologischen System mehrere Faktoren gemeinsam auftreten und eine gemeinsame Wirkung entfalten können. Für NIV und ZON wurden die Werte wegen der niedrigen Wiederfindungsrate (Tab. 3.7) mit einem Faktor so korrigiert (Faktor 3 bzw. Faktor 10), dass eine direkte Vergleichbarkeit mit den anderen Toxinen gegeben ist.

Bei den 31 *F. graminearum*-Isolaten bestehen, wie schon unter 3.3.2.7 beschrieben, signifikante Beziehungen zwischen der Produktion von DON und ADON sowie den daraus gebildeten Summenwerten 4 und 5. Ebenso korreliert ZON mit dem Summenwert 5, in den es selbst

als Summand eingeht. Auch zwischen den Aggressivitätsparametern bestehen die schon beschriebenen signifikanten Beziehungen (3.4.2.5). Die Korrelation zwischen Verbräunungslänge und Stängelumfassung ist stärker als die beider Parameter zur Befallshäufigkeit.

Allerdings können keine Signifikanzen zwischen den Parametern zur Toxinbildung und Aggressivität festgestellt werden. Die engste Korrelation besteht hier mit $R = 0,24$ zwischen DON-Bildung (1) und Stängelumfassung ohne Nullwerte (10) und ebenfalls DON+ADON-Bildung (4) und Verbräunungslänge ohne Nullwerte (9) (jeweils $p = 0,20$). Die Korrelation zwischen (1) und (10) ist in Abb. 3.30 mit einer linearen Regression graphisch dargestellt. Bei den Trichothecen und deren Summenwerten gilt für die *F. graminearum*-Isolate generell, dass die Korrelationen zu den Aggressivitäts-Parametern ohne Nullwerte enger und die Irrtumswahrscheinlichkeiten kleiner werden als zu den Aggressivitäts-Parametern mit Nullwerten.

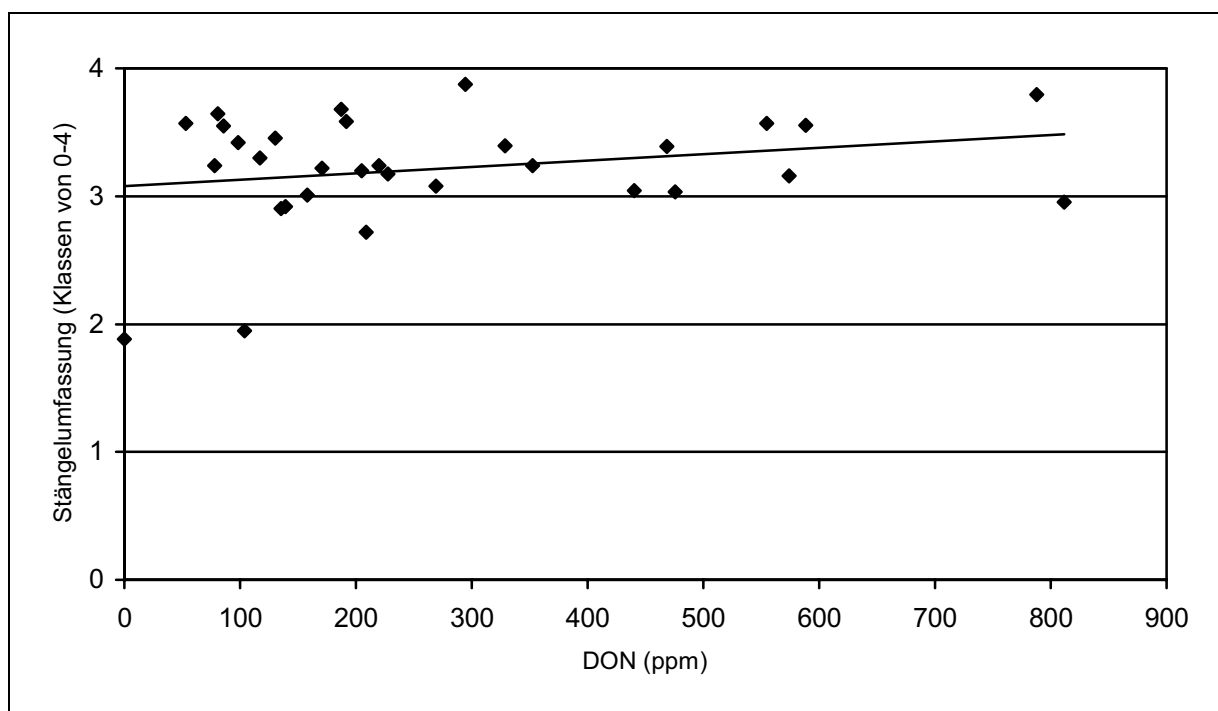


Abbildung 3.30: Korrelation zwischen der DON-Produktion auf Reis *in vitro* nach 21 Tagen in ppm und der Stängelumfassung des Symptoms an der Sprossbasis in Klassen von 0-4 (ohne Nullwerte) nach künstlicher Inokulation von Weizenkeimlingen nach sieben Tagen von 31 *F. graminearum*-Isolaten (lineare Regression).

Bei den acht Misch-Isolaten zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis. Wenn signifikante Zusammenhänge bestehen, dann nur zwischen Toxinbildungs-Parametern oder Aggressivitäts-Parametern untereinander, aber niemals zwischen Toxinbildungs- und Aggressivitäts-Parametern. Innerhalb der Toxinbildungs-Parameter treten weniger signifikante Beziehungen auf als bei den *F. graminearum*-Isolaten. So tritt hier beispielsweise keine Signifikanz zwischen DON- und ADON-Bildung auf (siehe 3.4.2.5), was vermutlich auf den Einfluss mehrerer Isolate mit abnormal hoher ADON-Bildung beruht.

3.6 Vergleich der vier *Fusarium graminearum*-Isolate vor und nach der Wirtspassage

Mit den vier *F. graminearum*-Isolaten 30, 31, 32 und 33 wurde eine Wirtspassage durchgeführt. Die Isolate nach der Wirtspassage wurden mit 34, 35, 36 und 37 bezeichnet.

3.6.1 Einfluss einer Wirtspassage auf die Mykotoxinproduktion

In Abb. 3.31 ist ein Vergleich der Mykotoxinbildung dieser vier Isolate vor und nach der Wirtspassage dargestellt. Zur statistischen Verrechnung wurden die Isolate vor und nach der Wirtspassage jeweils paarweise verglichen (t-Test).

Für alle drei auftretenden Toxine trat bei mindestens einem Isolat ein signifikanter Einfluss der Wirtspassage auf.

Isolatepaar 30/34 bildete nach der WP signifikant weniger DON als vor der WP (Abb. 3.31, oben), Isolatepaar 31/35 signifikant mehr. Beim schwachen Toxin-Bildner 32/36 sowie bei Isolatepaar 33/37 waren keine signifikanten Unterschiede in der DON-Bildung vor und nach der WP zu erkennen.

Bei der Bildung von ADON (Abb. 3.31, Mitte) zeigte nur Isolatepaar 31/35 einen signifikanten Effekt. Nach der WP wurde mehr ADON gebildet als vorher. Die Isolatepaare 30/34 und 33/37 zeigten keine signifikanten Unterschiede. Isolatepaar 32/36 bildete auch hier in beiden Fällen keine nennenswerten Toxin-Mengen.

Unterschiede in der ZON-Bildung zeigten die Isolatepaare 31/35 mit signifikant weniger und 33/37 mit signifikant mehr ZON nach der WP (Abb. 3.31, unten). Bei den anderen Isolatepaaren traten keine signifikanten Unterschiede auf. Das Isolatepaar 32/36 bildete nur relativ wenig ZON.

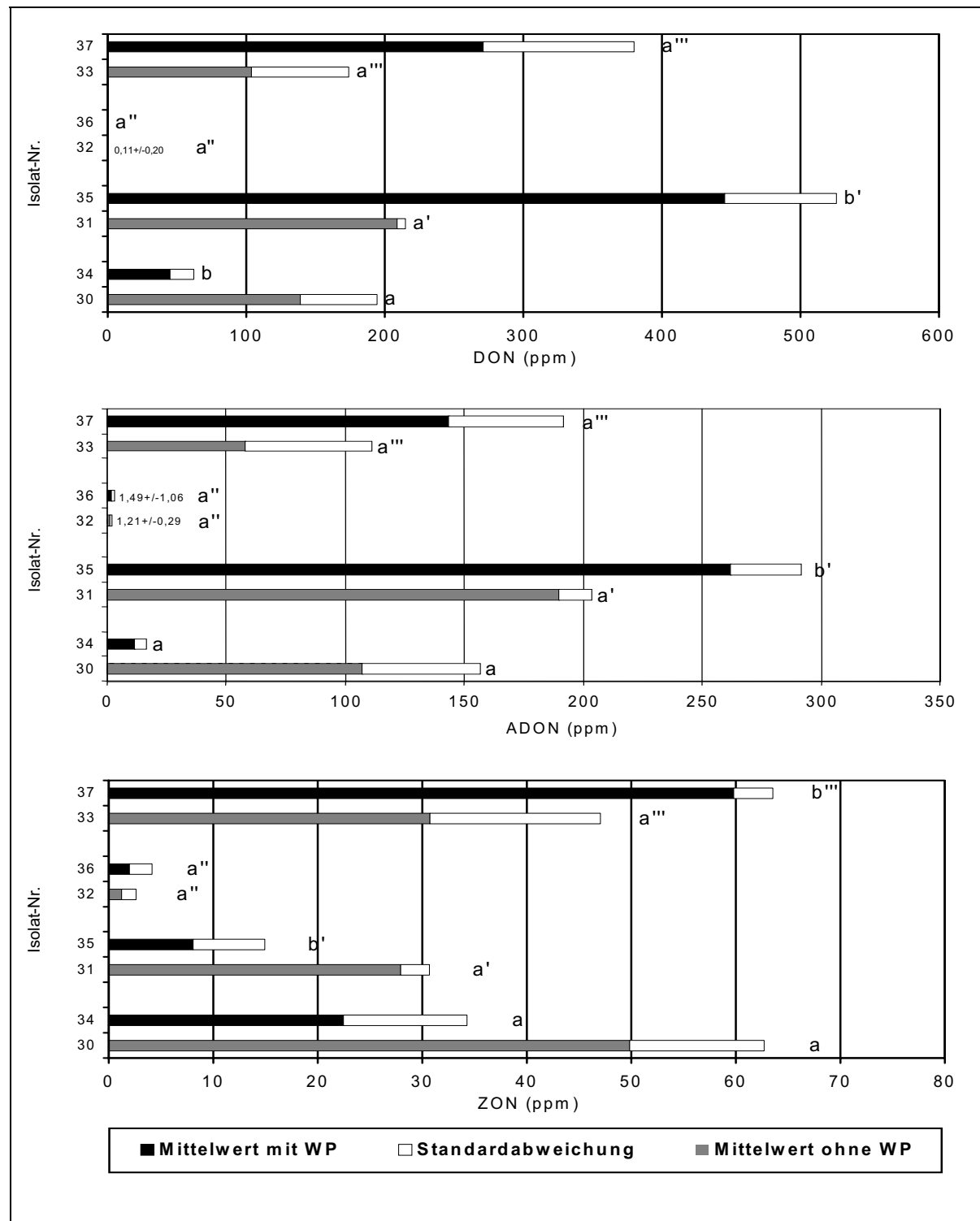


Abbildung 3.31: Vergleich der Mykotoxinbildung der vier *F. graminearum*-Isolate 30 (34), 31 (35), 32 (36), 33 (37) vor bzw. nach (Isolat-Bezeichnung in Klammern) einer Wirtspassage nach 21 Tagen auf Reis *in vitro*. Mittelwert aus drei WDH und Standardabweichung. ZON im unteren, ADON im mittleren, DON im oberen Diagramm. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (paarweiser Vergleich vor und nach der WP mit t-Test, $p=0,05$).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für keines der Mykotoxine für alle untersuchten Isolate ein einheitlicher Trend zu mehr oder weniger Toxin nach der Wirtspassage festzustellen war. Die Isolate verhalten sich heterogen. Das Isolatepaar 32/36 als insgesamt schwacher Toxin-Bildner zeigte nirgends signifikante Unterschiede, das Isolatepaar 31/35 zeigte für DON, ADON und ZON signifikante Unterschiede. DON und ADON wurden nach der WP von diesem Isolatepaar verstärkt gebildet, ZON weniger. Isolatepaar 30/34 bildete nach der Wirtspassage signifikant weniger DON. Isolatepaar 33/37 produzierte nach der WP signifikant mehr ZON.

Auffällig war, dass für die einzelnen Isolate die Trichothecenbildung (DON und ADON) jeweils dieselbe Tendenz zeigte, während ZON sich unabhängig davon verhielt.

3.6.2 Einfluss einer Wirtspassage auf die Aggressivität

In Abbildung 3.32 ist ein Vergleich der Aggressivität der vier Isolate vor und nach der Wirtspassage dargestellt. Als Parameter diente die Symptomausprägung nach sieben Tagen im Aggressivitätstest (3.4.). Auch hier wurden zur statistischen Verrechnung die Isolate vor und nach der Wirtspassage jeweils paarweise verglichen (t-Test).

Für die Verbräunungslänge traten bei den Isolaten vor der Wirtspassage bei drei von vier Isolaten signifikante Niveau-Unterschiede zwischen in den beiden Versuchs-Ansätzen auf (WDH 1-4 und WDH 5-8). Da diese Unterschiede aber weder für alle Isolate noch für alle Parameter auftraten, wurde der Mittelwert über alle acht WDH gebildet (führt zu einem konservativeren Ergebnis).

Bei allen drei Aggressivitätsparametern traten signifikante Unterschiede vor und nach der WP für mindestens ein Isolatepaar auf.

Bei der Verbräunungslänge (Abb. 3.32, oben) war der Wert bei den Isolatepaaren 32/36 und 33/37 nach der WP signifikant höher als vorher. Bei den Isolatepaaren 30/34 und 31/35 war dieser Unterschied nicht signifikant.

Das Ausmaß der Stängelumfassung zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 3.32, Mitte). Nur für die Isolatepaare 32/36 und 33/37 sind die Symptome nach der WP signifikant höher.

Die Befallshäufigkeit (Abb. 3.32, unten) war nach der WP nur für Isolatepaar 33/37 signifikant höher. Die drei übrigen Paare zeigten keine signifikanten Unterschiede.

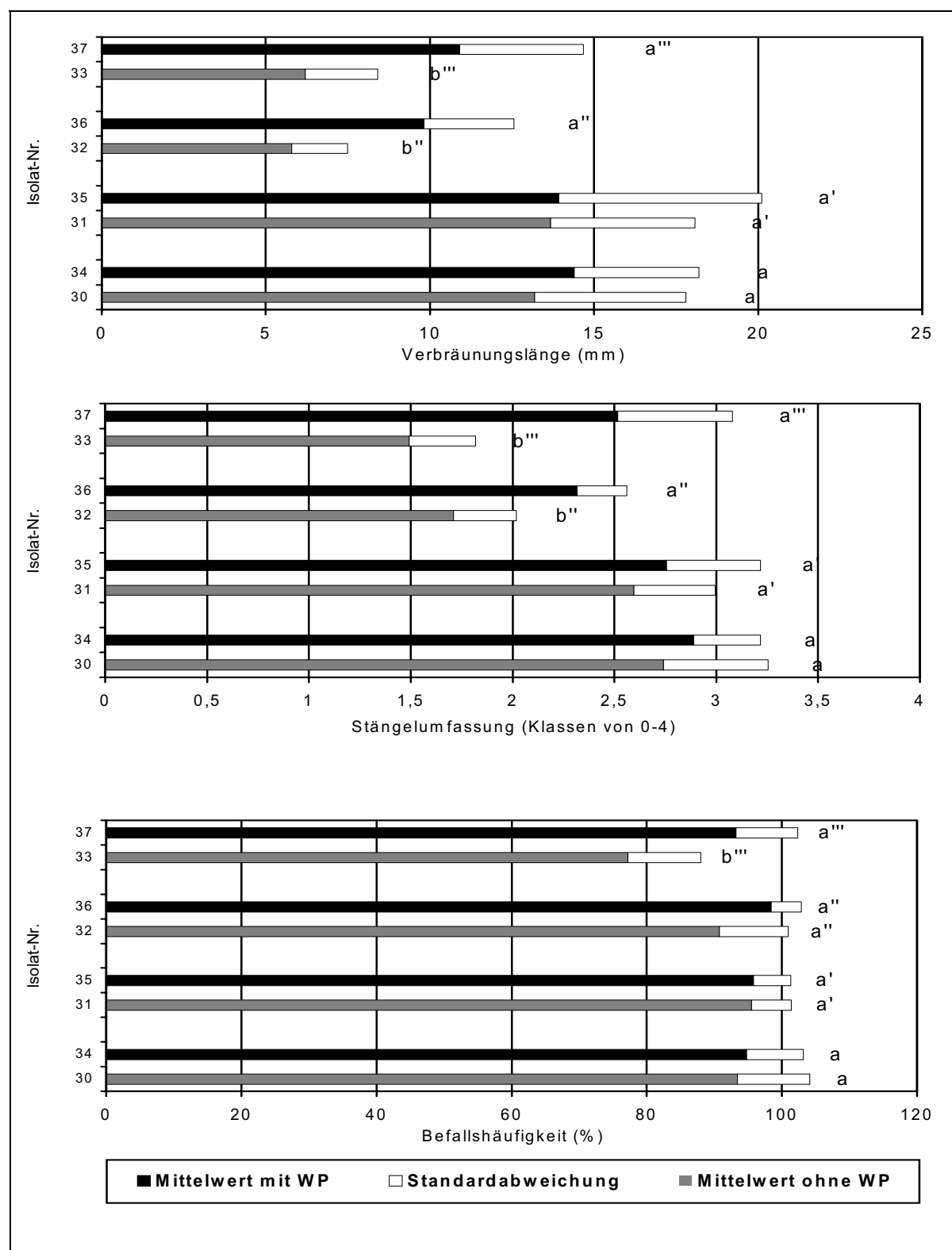


Abbildung 3.32: Vergleich der Aggressivität der vier *F. graminearum*-Isolate 30 (34), 31 (35), 32 (36), 33 (37) vor bzw. nach (Isolat-Bezeichnung in Klammern) einer Wirtspassage an Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation. Mittelwert aus acht WDH und Standardabweichung. Isolat 35 mit nur sieben WDH. Befallshäufigkeit im unteren, Stängelumfassung im mittleren, Verbräunungslänge im oberen Diagramm. Pflanzen ohne Symptome gehen als Nullwerte in den Mittelwert mit ein. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (paarweiser Vergleich vor und nach der WP mit t-Test, $p = 0,05$).

Auch wenn die nicht befallenen Pflanzen (Nullwerte) nicht in den Mittelwert mit einbezogen werden, blieb diese Tendenz zu höherer Aggressivität nach der Wirtspassage erhalten. Nur der Unterschied bei der Verbräunungslänge für Isolatepaar 33/37 war nicht mehr statistisch absicherbar. Also können die Unterschiede bei den Parametern Verbräunungslänge und Stängelumfassung nicht ausschließlich mit der unterschiedlichen Befallshäufigkeit erklärt werden.

Zusammenfassend gilt, dass alle drei Aggressivitätsparameter für alle Isolatepaare nach der Wirtspassage höher lagen. Deutlicher waren diese Unterschiede für die Isolatepaare 32/36 und 33/37.

Eine Wirtspassage hatte also generell eine positive, teils signifikante Auswirkung auf die Aggressivität eines *F. graminearum*-Isolats. Dieser Einfluss des Faktors Wirtspassage wurde über alle Isolatepaare berechnet (Varianz-Analyse mittels GLM-Procedure) und wird so auch in Tab. 3.12 deutlich. Hier zeigt sich außerdem für die Verbräunungslänge, dass eine Signifikanz dann vorliegt, wenn die nicht befallenen Pflanzen (Nullwerte) mit in die Berechnung der Mittelwerte eingehen, da auf diese Weise der Parameter Befallshäufigkeit mit repräsentiert wird. Bei der Stängelumfassung wirkte sich die Berücksichtigung der Nullwerte auf den p-Wert aus.

Tabelle 3.12: Irrtumswahrscheinlichkeiten p für die Hypothese, dass der Faktor Wirtspassage einen Einfluss auf die jeweils abhängige Variable hat ($n_{\text{vor der WP}} = 32$, $n_{\text{nach der WP}} = 31$). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder * ($p < 0,001$). o. N. = ohne Nullwerte.**

	Mittelwert vor WP	Mittelwert nach WP	LSD	p
Verbräunungslänge	9,71 *	12,21	2,40	0,0422
Stängelumfassung	2,14 **	2,62	0,29	0,0015
Befallshäufigkeit	89,2 *	95,6	4,89	0,0120
Verbräunungslänge o. N.	10,73	12,76	2,39	0,0949
Stängelumfassung o. N.	2,37 **	2,74	0,26	0,0054

3.7 Ergebnisse zu den Ähren-Inokulationen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zu den insgesamt vier Ähren-Inokulationen (Tab. 2.6) wiedergegeben. In den Unterkapiteln werden vorerst Ergebnisse zur Entwicklung des Befalls und des Deoxynivalenol-Gehalts (DON) *in vivo* vorgestellt. Hierauf folgend werden Korrelationen zwischen den einzelnen Größen wiedergegeben, und zwar erst auf Ebene der Einzelähren, dann auf Ebene der vier untersuchten *Fusarium graminearum*-Isolate.

3.7.1 Vorversuch zur Sporendichte im Inokulum

Die Ähren in diesem Versuch wurden mit verschiedenen Sporendichten eines Misch-Inokulums aus verschiedenen *F. graminearum*-Isolaten (siehe Anhang A.10) infiziert und bis 28 dpi bonitiert (Abb. 3.33), um eine geeignete Sporendichte zu ermitteln (2.7).

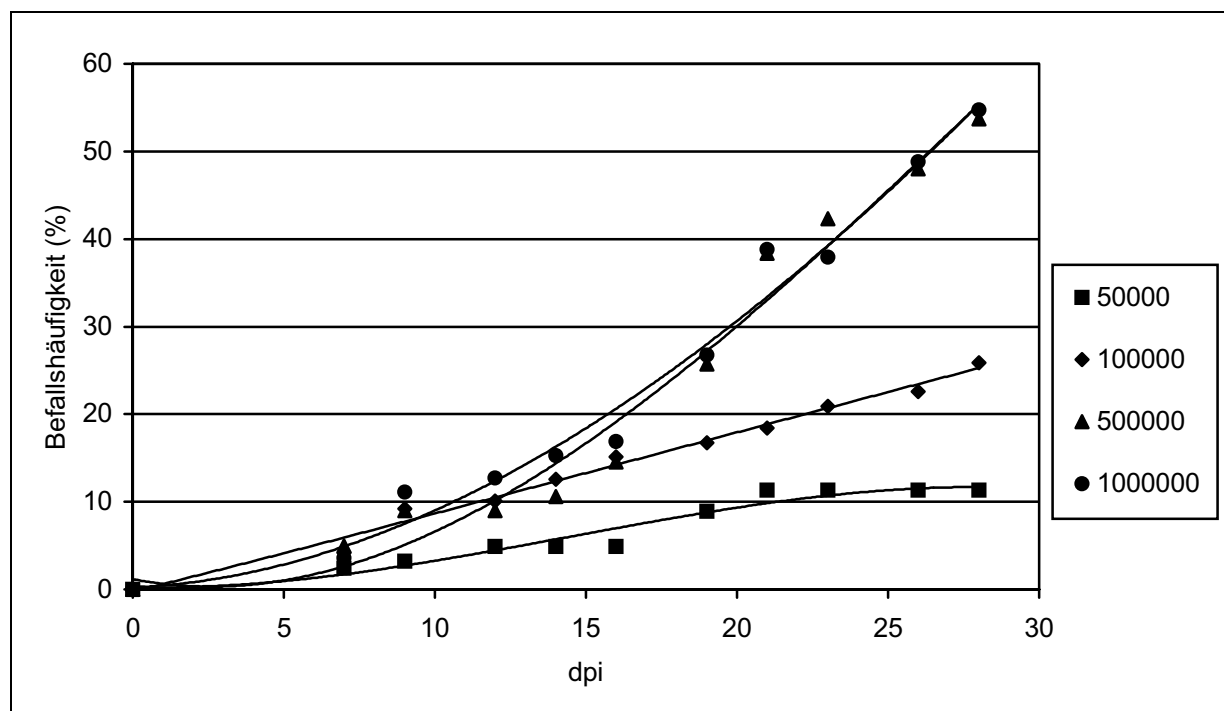


Abbildung 3.33: Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Pico) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 28 dpi in %. Vergleich verschiedener Sporendichten des Misch-Inokulums (18 *Fusarium*-Isolate, siehe Anhang A.10). Die Werte in der Legende geben die Sporendichte in Sporen/ml an. Pro Variante wurden 5 Ähren bonitiert. Regression: Polynom 3. Grades.

Ab einer Sporendichte von 5×10^4 Sporen/ml traten nach sieben Tagen Symptome auf. Während sich bei den Sporendichten 1×10^5 , 5×10^5 und 1×10^6 Sporen/ml bis 16 dpi ein einheitlicher starker Anstieg der Befallshäufigkeit der Ährchen auf etwa 16 % abzeichnete, verlief der Befall von 5×10^4 Sporen/ml wesentlich flacher und erreichte mit abnehmender Steigung zum Versuchsende (28 dpi) einen Wert von 11 %. Ab 16 dpi stieg der Befall bei den Sporendichten 5×10^5 und 1×10^6 Sporen/ml sprunghaft an und endete nach 28 dpi für beide Varianten bei etwa 54 %. Der Befall für die Sporendichte 1×10^5 Sporen/ml hingegen entwickelte sich kontinuierlich mit gleichmäßiger Steigung bis zum Versuchsende weiter (26 %). Sporendichten von 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 und 1×10^4 Sporen/ml zeigten während des gesamten Versuchs keinen nennenswerten Befall (< 1 %) und wurden in der Abb. 3.33 nicht mit dargestellt.

Für die weiteren Ähren-Inokulationen wurde die Dichte 1×10^5 Sporen/ml ausgewählt, die in der Lage war, einen deutlichen, aber nicht zu starken Befall zu verursachen.

3.7.2 Erste Ähren-Inokulation (Isolate 34 und 37)

3.7.2.1 Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts

Abb. 3.34 zeigt den Verlauf der Befallshäufigkeit von der Inokulation bis zum Versuchsende nach 63 Tagen. An den nicht inokulierten Kontroll-Ähren konnte abgelesen werden, dass ab etwa 25 dpi verstärkt Sekundär-Infektionen auftraten.

Der Befall zeigte einen sigmoiden Verlauf. Die ersten Symptome traten bei beiden Isolaten nach 4 Tagen auf. Die Befallshäufigkeit stieg in den ersten Tagen sehr stark an (Isolat 37: von 2 auf 25 % von 4 bis 6 dpi). Dieser nahezu exponentielle Anstieg ging ab etwa 7 dpi in einen eher linearen Anstieg über. Dieser setzte sich bis etwa 28 dpi fort. Isolat 34 hatte nun eine Befallshäufigkeit von 77 %, Isolat 37 von 80 % erreicht. Der Befallsverlauf näherte sich nun allmählich und mit abnehmender Steigung einem Höchstwert an, der für beide Isolate bei 100 % lag (63 dpi). Da die zur Verfügung stehenden Regressionen diesen Verlauf nicht deutlich wiedergegeben hätten, wurde auf eine Regression verzichtet. Isolat 37 zeigte fast ausnahmslos die höhere Befallshäufigkeit, dieser Unterschied war aber zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Der Wassergehalt der Ähren nahm mit fortschreitender Zeit sowohl für die Kontrolle als auch für die inokulierten Ähren ab (Abb. 3.35).

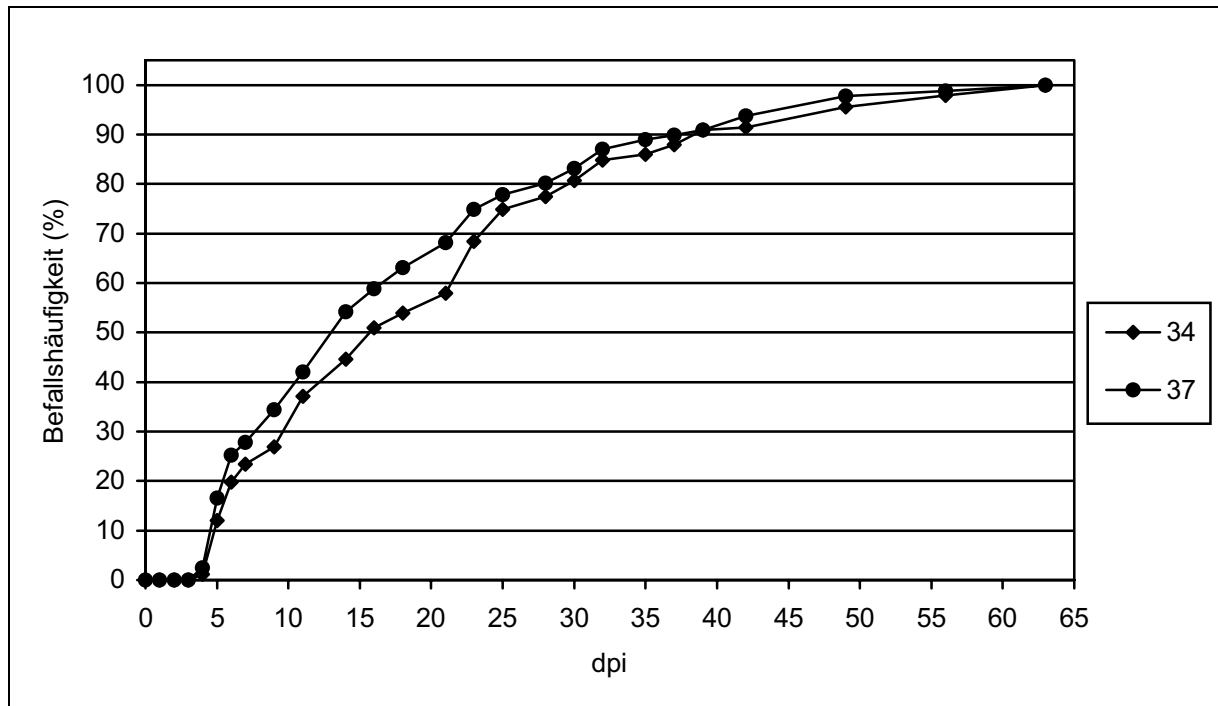


Abbildung 3.34: Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 63 dpi in Prozent. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 34 und 37. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 33$ (0 dpi) bedingt durch die Probenahme auf $n = 6$ (63 dpi) ab. Zu keinem Zeitpunkt traten signifikante Unterschiede auf ($\alpha = 0,05$).

Der Verlauf des Wassergehalts der Kontrolle zeigte einen leicht sigmoiden Verlauf. In den ersten 14 Tagen war die Abnahme (Startwert etwa 70 % gering (um etwa 5 %)). Dem folgte bis 49 dpi eine etwa lineare Phase, der eine wiederum langsamere Abnahme folgte. Zur Ernte 63 dpi wurde ein Tiefstwert zwischen 5 und 10 % erreicht.

Prinzipiell ähnelte die Entwicklung des Wassergehalts bei den inokulierten Ähren dem der Kontrolle. Der Verlauf war ebenfalls sigmoid, aber mit einer sehr viel stärkeren negativen Steigung. Die Abnahme des Wassergehalts begann früher (ab 7 dpi; Kontrolle: ab 14 dpi) und vollzog sich sehr viel schneller. Schon nach 35 Tagen waren für die Isolate 34 und 37 schon weniger als 15 % Wassergehalt erreicht (Kontrolle: 35 bis 40 %). Der Endwert war für die Isolate 34 und 37 mit dem der Kontrolle vergleichbar. Der Wassergehalt für beide Isolate unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant.

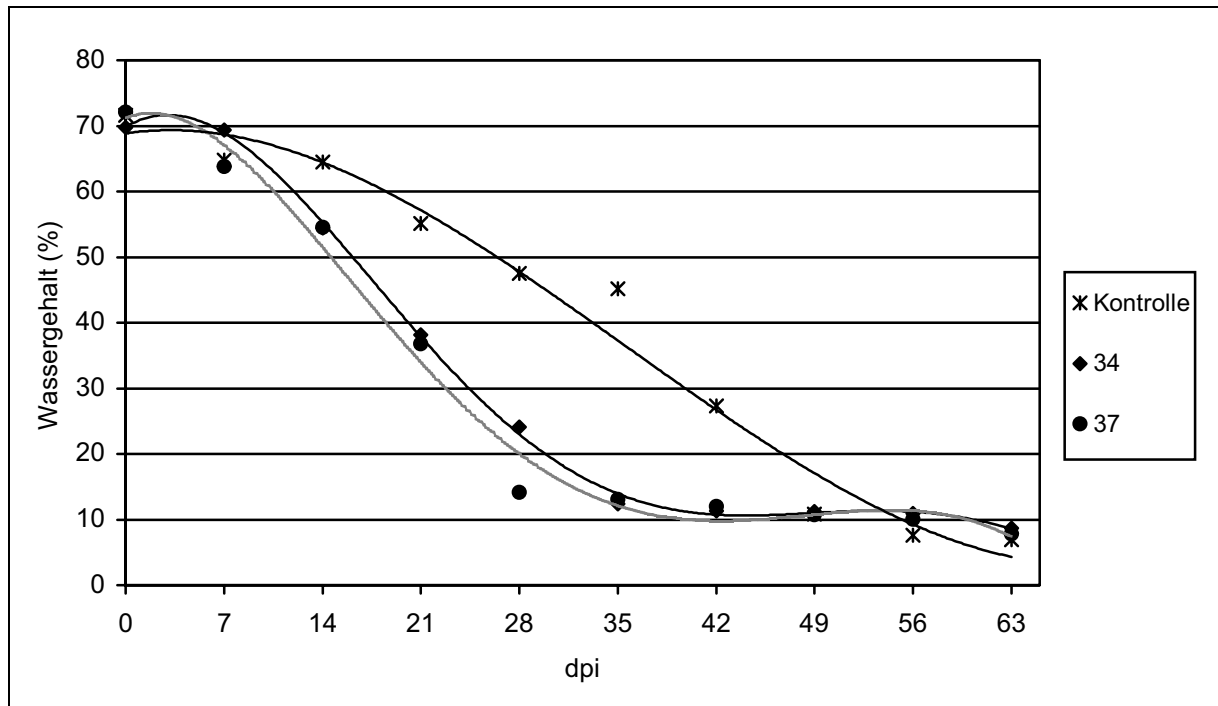


Abbildung 3.35: Entwicklung des Wasser-Gehalts ganzer Ähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 63 dpi in Prozent. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 34 und 37 (n=3) mit nicht inokulierten Kontrollähren (n=1). Regression: Polynom 3. Grades (Kontrolle), 5. Grades (Isolat 37), 6. Grades (Isolat34). Helle Linie: Isolat 37. Zu keinem Zeitpunkt traten signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten auf ($\alpha = 0,05$).

Auch der Verlauf des DON-Gehalts ganzer Weizenähren zeigte von der Tendenz ein sigmoides Bild (Abb. 3.36). Als Bezugsgröße diente hier "Gramm Trockenmasse" (DON 1). Die sigmoide Kinetik zu Beginn der Infektion blieb allerdings fraglich, da die Datenaufnahme erst bei 7 dpi begann und eine frühe exponentielle Phase so nicht ausreichend erfasst werden konnte. Von 7 bis 21 dpi konnte man von einer sehr starken fast linearen Zunahme des DON-Gehalts sprechen.

Nach 28 Tagen erreichte Isolat 37 mit etwa 200 ppm einen Höchstwert, um dann bis zum Versuchsende (63 dpi) eine tendenzielle Abnahme des DON-Gehalts zu zeigen (auf etwa 150 ppm). Betrachtet man die Einzelwerte, so war aber beispielsweise die Abnahme vom Wert bei 21 dpi auf den Wert bei 63 dpi nicht signifikant. Die Werte schwankten vielmehr um einen Höchstwert.

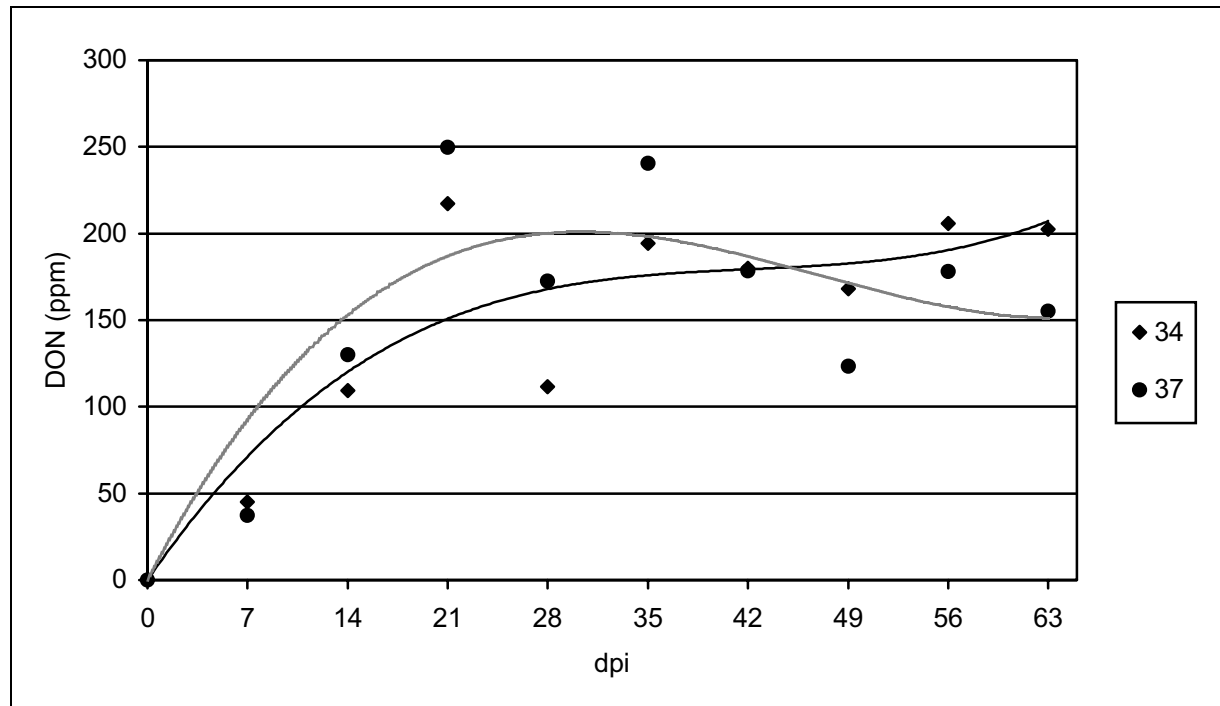


Abbildung 3.36: Entwicklung des DON-Gehalts (ppm \triangleq mg/kg TM (DON 1)) ganzer Ähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 63 dpi. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 34 und 37 (n=3). Regression: Polynom 3. Grades. Helle Linie: Isolat 37. Zu keinem Zeitpunkt traten signifikante Unterschiede auf ($\alpha = 0,05$).

Isolat 34 hatte bei 28 dpi mit etwa 170 ppm ebenfalls schon den größten Teil der DON-Menge gebildet, die zur Ernte in den Ähren zu finden war (etwa 205 ppm). Die Regression für Isolat 34 zeigte bis Versuchsende einen leichten Anstieg des DON-Gehalts. Wertet man den sehr niedrigen Wert bei 28 dpi (112 ppm) als Ausreißer, dann wird trotz größerer Schwankungen der Einzelwerte ebenfalls ein Höchstwert angestrebt. Die beiden Isolate zeigten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich des DON-Gehalts ganzer Weizenähren.

3.7.2.2 Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern

auf Ebene der Einzelähren

Um die Bedeutung des Mykotoxins DON für das Wirt/Parasit-System Weizen/*F. graminearum* einschätzen zu können, wurde für beide Isolate eine Korrelationstabelle erstellt, in der der DON-Gehalt der Weizenähren mit verschiedenen weiteren relevanten Größen korreliert

wurde. Der DON-Gehalt wurde hierzu in dreifacher Form verwendet. Erstens wurde die DON-Menge auf die Trockenmasse bezogen (DON 1), zweitens diente nur die befallene Ährenmasse als Bezugsgröße (DON 2) und drittens wurde die DON-Menge pro Ähre berechnet (DON 3), wie unter 2.9.7.2.3 ausführlich beschrieben.

Tabelle 3.13: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (drei Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34 (7 dpi bis 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 27 Einzelähren in die Berechnung ein ($n = 27$). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge ($\mu\text{g}/\text{Ähre}$).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,83***	0,92***	-0,49**	-0,25	-0,43*	0,50**	0,49**
2	DON 2		0,75***	-0,09	-0,29	0,11	-0,05	0,02
3	DON 3			-0,28	0,10	-0,42*	0,50**	0,48*
4	Frischmasse (FM)				0,57**	0,77***	-0,72***	-0,63***
5	Trockenmasse (TM)					-0,04	0,09	-0,07
6	Wassergehalt (WG)						-0,97***	-0,77***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,83***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Die verwendeten acht Parameter können in drei Gruppen gegliedert werden: erstens die drei Größen zum DON-Gehalt (Parameter 1-3), zweitens die drei eher physikalischen Parameter Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM) und Wassergehalt (WG) der Ähren sowie drittens die beiden Befallparameter Befallshäufigkeit der Ährchen (BH) und die Fläche unter der Befallskurve (FUBK). Die Parameter innerhalb jeder dieser Gruppen stehen in teilweise enger Beziehung zueinander, weil sie entweder rechnerisch miteinander verknüpft sind, oder aber

dieselbe Datengrundlage besitzen. Korrelationen, die innerhalb dieser Gruppen auftreten, sollten daher nicht überbewertet werden und werden in den folgenden Besprechungen nicht berücksichtigt. Außerdem werden nur die signifikanten Korrelationen besprochen.

Insgesamt zeigte DON 1 bei Isolat 34 viele signifikante Korrelationen (Tab. 3.13). DON 1 korrelierte mit der Frischmasse und dem Wassergehalt (hoch) signifikant, außerdem mit beiden Befallsparametern. Die engste Korrelation bestand zur Befallshäufigkeit der Ährchen mit $R = 0,50$. DON 2 korreliert mit keiner der übrigen Größen signifikant. DON 3 zeigte ein ähnliches Muster wie DON 1, außer dass die Beziehung zur Frischmasse nicht signifikant war.

Tabelle 3.14: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 37 (7 dpi bis 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 27 Einzelähren in die Berechnung ein ($n = 27$). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge ($\mu\text{g}/\text{Ähre}$).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,89***	0,85***	-0,65***	-0,48*	-0,36	0,41*	0,27
2	DON 2		0,70***	-0,39*	-0,57**	0,04	0,01	-0,11
3	DON 3			-0,43*	-0,02	-0,45*	0,52**	0,30
4	Frischmasse (FM)				0,52**	0,74***	-0,66***	-0,58**
5	Trockenmasse (TM)					-0,16	0,20	0,05
6	Wassergehalt (WG)						-0,96***	-0,78***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,82***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Ferner zeigte die Frischmasse eine höchst signifikante negative Korrelation zu beiden Befallsparametern (Tab. 3.13). Die Trockenmasse korrelierte mit keiner der übrigen Größen in

signifikanter Weise. Der Wassergehalt zeigte eine sehr starke und höchst signifikante Korrelation zu den Befallsparametern.

Für die Zusammenhänge bei Isolat 37 (Tab. 3.14) ergab sich ein ähnliches Bild wie für Isolat 34, da schon im Infektionsverlauf nur geringe Unterschiede auftraten (Abb. 3.34 bis Abb. 3.36).

DON 1 zeigte zur Frischmasse und zur Trockenmasse eine (höchst) signifikante negative Korrelation, nicht aber zum Wassergehalt oder zur Fläche unter der Befallskurve. Die signifikante Korrelation zur Befallshäufigkeit war mit $R = 0,41$ nicht ganz so eng wie für Isolat 34 und auf einem niedrigeren Signifikanzniveau angesiedelt. DON 2 stand im Gegensatz zu Isolat 34 in einer (hoch) signifikanten Beziehung zur Frisch- und zur Trockenmasse. DON 3 korrelierte signifikant bzw. hoch signifikant mit den Parametern Frischmasse, Wassergehalt und Befallshäufigkeit.

Ferner stand die Frischmasse zu beiden Befallsparametern in hoch oder höchst signifikanter Beziehung. Die Trockenmasse zeigte auch bei diesem Isolat keine signifikante Korrelation zu den Befallsparametern. Der Wassergehalt hingegen korrelierte entsprechend den Ergebnissen von Isolat 34 wieder höchst signifikant sowohl mit der Befallshäufigkeit als auch mit der Fläche unter der Befallskurve.

Eine zusammenfassende gemeinsame Betrachtung der Isolate 34 und 37 zeigt, dass sehr viele Gemeinsamkeiten auftraten, und auch eine gemeinsame Korrelationstabelle zeigte keine grundlegenden neuen Erkenntnisse (siehe Anhang A.10). Die deutlichste Korrelation der DON-Parameter trat zwischen DON 1 und der Frischmasse auf ($R = -0,57$), gefolgt von der Beziehung zwischen DON 3 und Befallshäufigkeit ($R = 0,51$) bzw. DON 1 und Befallshäufigkeit ($R = 0,46$). Alle diese Beziehungen waren höchst signifikant.

In Abb. 3.37 ist die Befallshäufigkeit der Ährchen in Abhängigkeit von DON 1 aufgetragen. Die Datenpunkte der beiden Isolate sind zur Unterscheidung verschieden dargestellt. Die beiden Datenwolken der Isolate 34 und 37 zeigten keinen nennenswerten Unterschied in ihrer Lage oder Größe. Auch die logarithmischen Regressionen waren sehr ähnlich. Die logarithmische Darstellung lieferte eine bessere Annäherung als eine lineare. Auffällig ist, dass die Variation im DON-Gehalt bei hohen Befallswerten (nahe 100 %) relativ groß war.

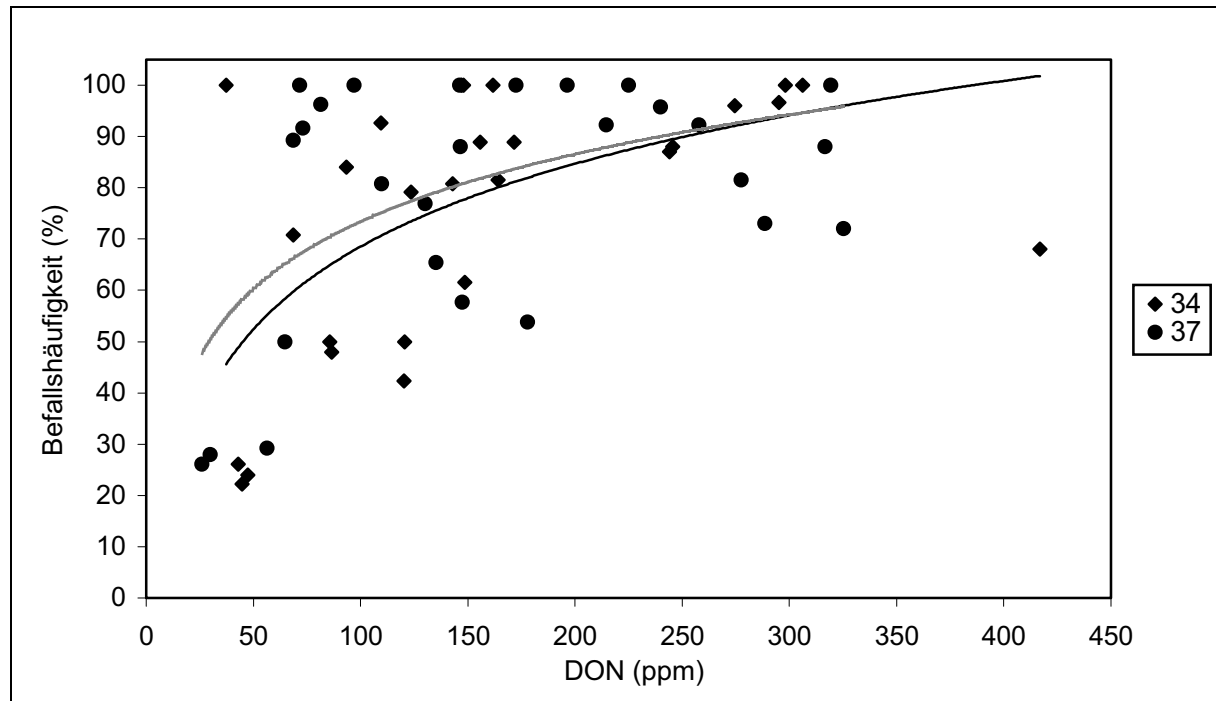


Abbildung 3.37: Korrelation zwischen dem DON-Gehalt ($\text{ppm} \triangleq \text{mg/kg TM (DON 1)}$) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Befallshäufigkeit der Ährchen nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34 oder Isolat 37 (7 dpi bis 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 54 Einzelähren in die Darstellung ein ($n = 54$). Logarithmische Regression. Helle Linie = Isolat 37.

3.7.3 Zweite Ähren-Inokulation (Isolate 35 und 36)

3.7.3.1 Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts

Abb. 3.38 zeigt den Verlauf der Befallshäufigkeit von der Inokulation bis zum Versuchsende nach 42 Tagen. Die nicht inokulierten Kontrollähren zeigten, dass in diesem Versuch keine nennenswerten Sekundär-Infektionen auftraten (BH immer unter 2 %, Maximalwert bei 31 dpi).

Der Verlauf der Befallshäufigkeit zeigte für beide Isolate ein ähnliches Bild, aber auf unterschiedlichem Niveau. Eine sigmoide Kinetik (siehe Abb. 3.34) trat hier nicht auf. Nach 4 Tagen traten die ersten Symptome auf und bei 10 dpi war eine Befallshäufigkeit von ca. 15 % (Isolat 35) bzw. ca. 9 % (Isolat 36) erreicht. Der weitere nahezu lineare Befallsverlauf wurde von einem charakteristischen Muster der Einzelwerte unterlagert: Der Verlauf ging in einem Wechsel von Phasen stärkeren und schwächeren Anstiegs vonstatten.

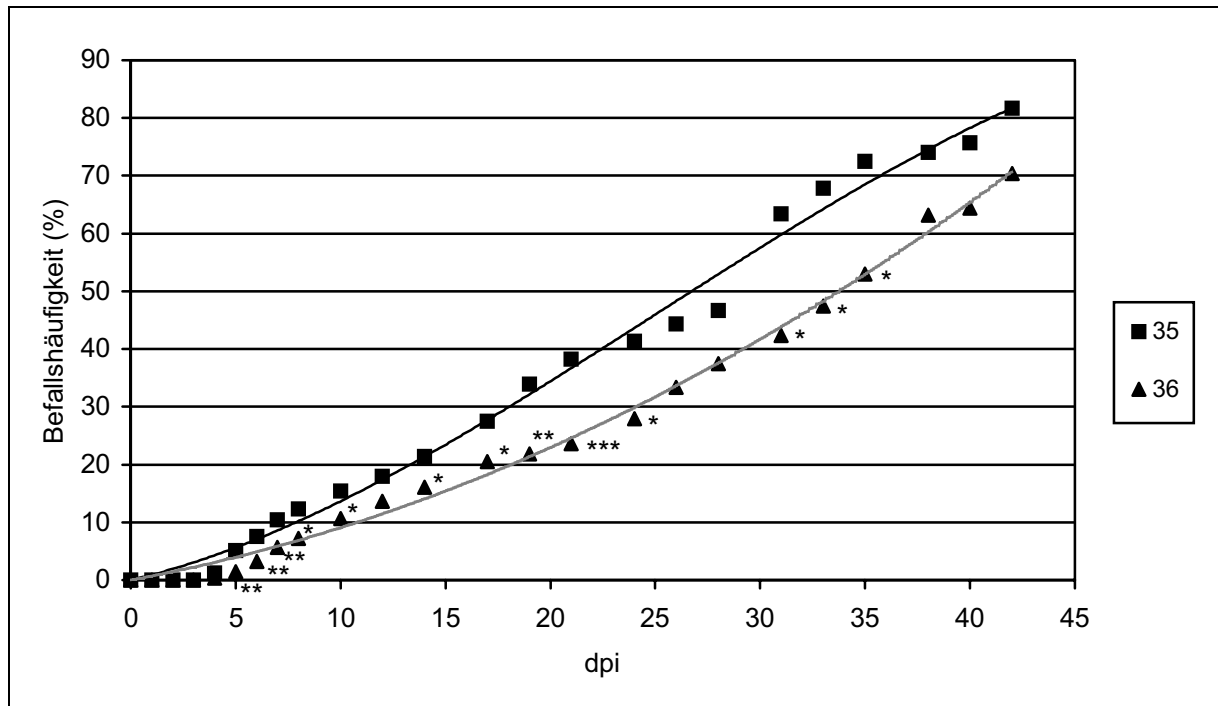


Abbildung 3.38: Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 42 dpi in Prozent. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 35 und 36. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 38$ (0 dpi) bedingt durch die Probennahme auf $n = 7$ (Isolat 35) oder $n = 5$ (Isolat 36) ab (42 dpi). Regression: Polynom 3. Grades; helle Linie: Isolat 36. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Etwas ausgeprägter war dieses Muster bei Isolat 35. Beispielsweise stieg die Befallshäufigkeit von 28 bis 31 dpi um 16 % an, von 31 bis 33 dpi nur um 5 %. Nach 42 Tagen wurde der Versuch beendet, da nicht mehr genug auswertbare Ähren zur Verfügung standen. Während des Versuchs mussten mehrere Ähren aus der Wertung genommen werden, die einen sehr starken anstieg atypischer Symptome zeigten (siehe 2.7.1.4). Der Endwert betrug für Isolat 35 82 % und für Isolat 36 70 %.

Stets war die Befallshäufigkeit von Isolat 35 höher als die von Isolat 36. Für 13 der 20 Bonitur-Tage mit Symptomen war dieser Unterschied signifikant, teils hoch oder sogar höchst signifikant.

Im Vergleich zu Versuch 1 (Abb. 3.34) verlief die Befallskurve eher flach und die Phase, in der ein Höchstwert für die Befallshäufigkeit angestrebt wurde, wurde offenbar wegen des

frühen Versuchsendes nicht erreicht. Aber auch insgesamt war die Befallshäufigkeit nach 40 Tagen eher niedrig. Bei Versuch 1 wurden die 90 % zu diesem Zeitpunkt schon überschritten. Im Gegensatz zu Versuch 1 zeigten sich hier signifikante Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Isolaten.

In Abb. 3.39 sind die Ergebnisse einer anderen Boniturmethode dargestellt, bei der der Befall der einzelnen Ährchen in einer Skala von 1 bis 9 bonitiert und dann als prozentuale Befallsstärke der Ährchen dargestellt wurde (siehe 2.7.1.4).

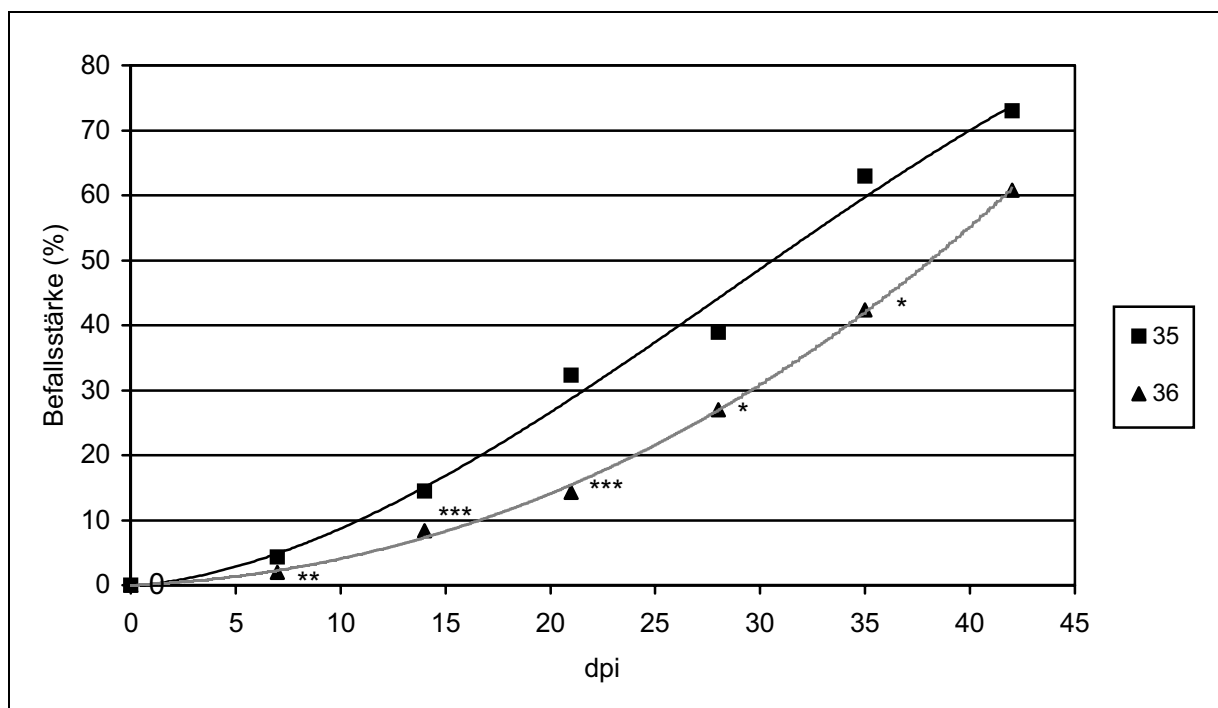


Abbildung 3.39: Verlauf der mittleren Befallsstärke der Ährchen (Sommerweizen Pico-lo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 42 dpi in Prozent. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 35 und 36. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 38$ (0 dpi) bedingt durch die Probennahme auf $n = 7$ (Isolat 35) oder $n = 5$ (Isolat 36) ab (42 dpi). Regression: Polynom 3. Grades; helle Linie: Isolat 36. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Das Ergebnis ist mit dem für die Befallshäufigkeit in Abb. 3.38 vergleichbar. Auch hier lag ein fast linearer Anstieg der Befallsstärke für beide Isolate auf einem unterschiedlichen Niveau vor. Isolat 35 zeigte stets eine höhere Befallsstärke als Isolat 36. Insgesamt lag die Befallsstärke etwas niedriger als die Befallshäufigkeit, da bei diesem Bonitur-Parameter eine

wesentlich höhere Auflösung vorliegt. Nach 42 Tagen erreichte Isolat 35 eine Befallsstärke von 73 %, Isolat 36 von 61 %.

Die Unterschiede zwischen den Isolaten sind immer mindestens signifikant, mit Ausnahme von 42 dpi. Auch bei 28 dpi, als bei der Befallshäufigkeit noch kein signifikanter Unterschied auftrat ($p = 0,13$), zeigte sich bei der Befallsstärke ein leicht signifikanter Unterschied ($p = 0,042$), was wiederum auf der stärkeren Auflösung dieses Bonitur-Parameters beruhen dürfte.

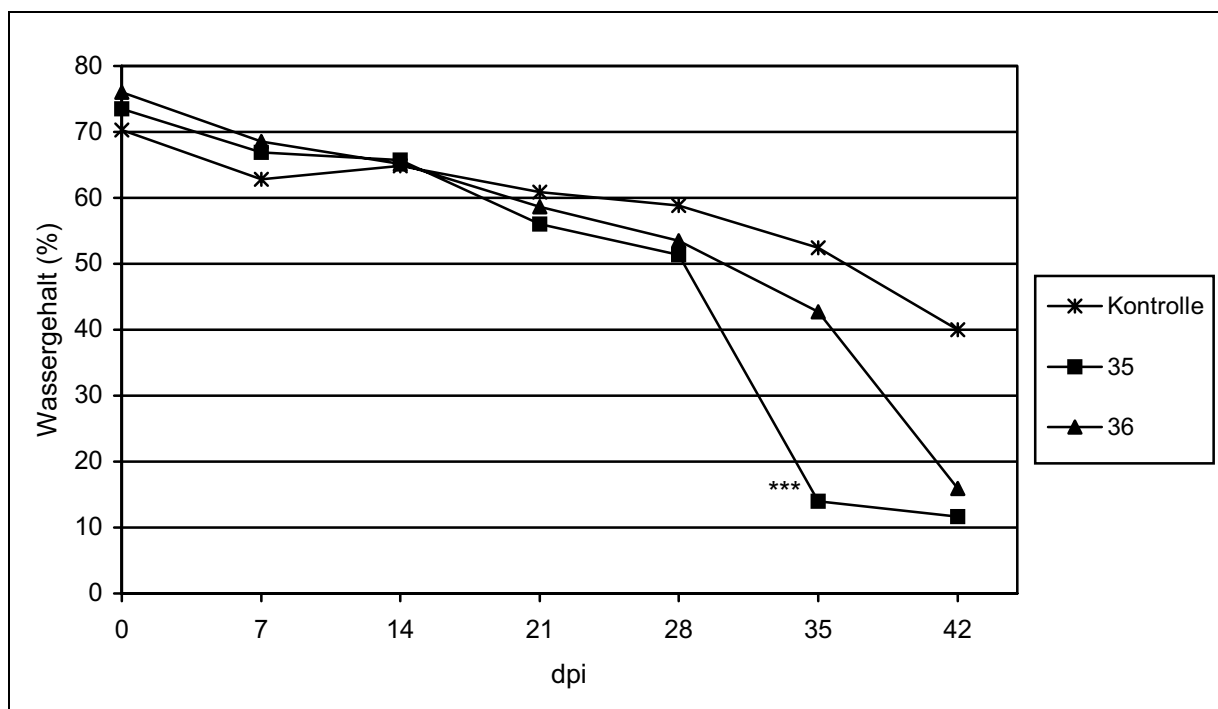


Abbildung 3.40: Entwicklung des Wasser-Gehalts ganzer Ähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 42 dpi in Prozent. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 35 und 36 ($n=3$) mit nicht inokulierten Kontrollähren ($n=1$). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder * ($p < 0,001$).**

Der Wassergehalt der Ähren (Abb. 3.40) nahm in den inokulierten Ähren und den Kontrollähren stetig ab. Bis 21 dpi traten im Wassergehalt kaum Unterschiede zwischen den inokulierten Ähren und den Kontrollähren auf (Isolat 35: 56 %, Isolat 36: 59 %, Kontrolle: 61 %). Dann erfolgte eine stärkere Austrocknung der inokulierten Ähren, besonders bei Isolat 35. Während Isolat 35 von 28 dpi bis 35 dpi eine Abnahme im Wassergehalt um 37 % zeigte (auf 14 %),

nahm der Wassergehalt bei Isolat 36 nur um 11 % ab (auf 43 %). Nach 42 Tagen endeten beide Isolate auf einem ähnlichen Niveau (Isolat 35: 12 %, Isolat 36: 16 %).

Isolat 35 zeigte ab 21 dpi kontinuierlich einen niedrigeren Wassergehalt als Isolat 36. Für 35 dpi waren dieser Unterschied höchst signifikant.

Verglichen mit Versuch 1 (Abb. 3.35) vollzog sich die Abnahme des Wassergehalts verzögert, aber dann umso schneller. Nach 28 Tagen lag in diesem Versuch ein Wassergehalt in der Größenordnung von 50 % vor, bei Versuch 1 von etwa 20 %. Erst ab 21 dpi setzte überhaupt eine merkliche Austrocknung ein, in Versuch 1 schon ab 7 dpi. Dieser verzögerte Verlauf wurde auch schon beim Befall beobachtet. Nach 42 Tagen war allerdings in beiden Versuchen ein einheitlicher Wassergehalt zwischen 10 und 15 % erreicht.

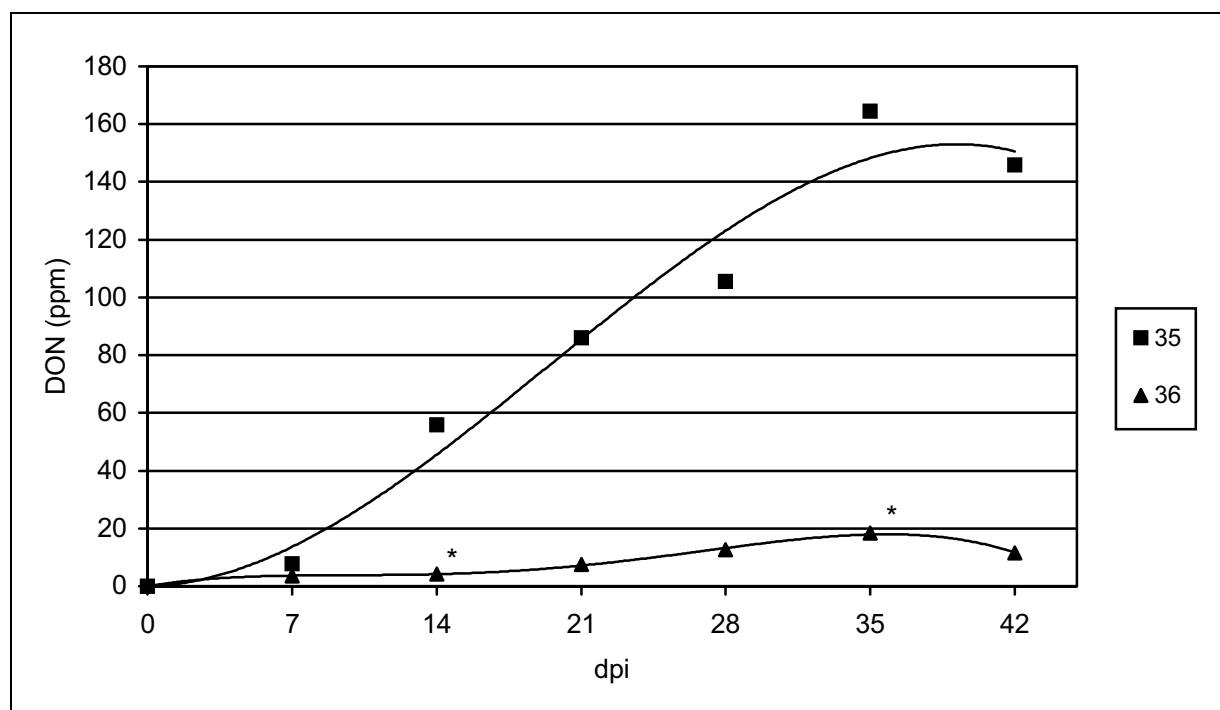


Abbildung 3.41: Entwicklung des DON-Gehalts (ppm $\hat{=}$ mg/kg TM (DON 1)) ganzer Ähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 42 dpi. Vergleich der beiden *F. graminearum*-Isolate 35 und 36 (n = 3). Regression: Polynom 3. Grades (Isolat 35) bzw. 4. Grades (Isolat 36). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder * (p < 0,001).**

Der DON-Gehalt (DON 1) der Weizenähren zeigte ein nur leicht sigmoides Bild (Abb. 3.41). Auch bei diesen beiden Isolaten konnte schon nach sieben Tagen DON nachgewiesen werden.

Nach einem linearen Anstieg schien sich der DON-Gehalt bei 150 ppm (Isolat 35) oder 18 ppm (Isolat 36) zu stabilisieren bzw. leicht abzunehmen.

Der prinzipielle Verlauf war für beide Isolate gleich, aber es traten beträchtliche Unterschiede im Niveau auf. Zeitweilig war der DON Gehalt bei Isolat 35 um etwa den Faktor zehn höher als bei Isolat 36 (14 dpi, 21 dpi, 42 dpi). Für 14 dpi und 35 dpi war dieser Unterschied signifikant.

Im Vergleich zu Versuch 1 (Abb. 3.36) zeigten sich hier deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten hinsichtlich des DON-Gehalts. Vom Niveau der Toxinbildung her lagen die Isolate 35 und 36 beide niedriger als die Isolate 34 und 37 aus Versuch 1.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass für das aggressivere Isolat (Isolat 35), das die stärkeren Symptome verursachte, auch der DON-Gehalt der befallenen Ähren deutlich höher war. Auffällig ist, dass der Unterschied im DON-Gehalt sehr viel deutlicher ausfiel als für die Befallshäufigkeit (Abb. 3.41).

3.7.3.2 Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern

auf Ebene der Einzelähren

Auch für die in diesem Versuch untersuchten Isolate 35 und 36 wurden Korrelationstabellen erstellt (siehe 3.7.2.2).

Für Isolat 35 traten viele signifikante Korrelationen auf (Tab. 3.15). DON 1 und DON 3 korrelierten mit allen Parametern außer der Trockenmasse hoch bzw. sogar höchst signifikant. DON 2 hingegen zeigte keinerlei signifikante Korrelation außer innerhalb der eigenen Parameter-Gruppe. Die engste Korrelation von DON 1 bestand mit $R = 0,75$ zur Fläche unter der Befallskurve. Die Frischmasse und der Wassergehalt der Ähren korrelierten höchst signifikant mit beiden Befallsparametern, die Trockenmasse zeigte keinerlei signifikante Zusammenhänge. Für Isolat 35 stand DON 1 wiederum zu allen Parametern außer der Trockenmasse in einer engen Beziehung.

Tabelle 3.15: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 35 (7 dpi bis 42 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 18 Einzelähren in die Berechnung ein (n = 18). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge (µg/Ähre).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,66**	0,96***	-0,73***	-0,26	-0,65**	0,70**	0,75***
2	DON 2		0,62**	-0,26	-0,36	-0,05	0,11	0,14
3	DON 3			-0,62**	-0,04	-0,63**	0,74***	0,75***
4	Frischmasse (FM)				0,40	0,86***	-0,74***	-0,83***
5	Trockenmasse (TM)					-0,09	0,26	0,009
6	Wassergehalt (WG)						-0,94***	-0,92***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,94***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Für Isolat 36 ergaben sich von der Tendenz her ähnliche Korrelationen (Tab. 3.16).

DON 1 stand hier zum Wassergehalt in signifikanter, zu den beiden Befallsparametern in höchst signifikanter Beziehung, nicht aber zur Frischmasse. Der deutlichste Bezug bestand mit R = 0,71 jeweils zur Befallshäufigkeit und der Fläche unter der Befallskurve. DON 2 zeigte eine signifikante Korrelation zur Trockenmasse, DON 3 korrelierte mit allen Parametern außer der Frischmasse.

Die Frischmasse zeigte keinerlei weitere signifikante Korrelation, während der Wassergehalt wiederum zu beiden Befallsparametern mindestens signifikant korrelierte, ebenso wie die Trockenmasse.

Auffällig ist, dass die Korrelationen bei Isolat 36 im Gegensatz zu Isolat 35 eher zur Trockenmasse als zur Frischmasse bestand. Zwischen DON 1 und dem DON-Gehalt pro befallene

ner Ährenmasse (DON 2) gab es anders als bei den drei anderen Isolaten gar keinen erkennbaren Zusammenhang. Eine mögliche Ursache hierfür wäre die verschieden große Varianz der einzelnen Parameter (siehe Abb. 3.42).

Tabelle 3.16: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 36 (7 dpi bis 42 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 18 Einzelähren in die Berechnung ein (n = 18). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge (µg/Ähre).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	-0,02	0,96***	-0,20	0,39	-0,51*	0,71***	0,71***
2	DON 2		-0,14	-0,22	-0,57*	0,44	-0,46	-0,40
3	DON 3			-0,09	0,60**	-0,61**	0,79***	0,78***
4	Frischmasse (FM)				0,50*	0,46	-0,34	-0,41
5	Trockenmasse (TM)					-0,52*	0,59**	0,55*
6	Wassergehalt (WG)						-0,94***	-0,95***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,98***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Eine Korrelationstabelle, die die Werte von den beiden Isolaten 35 und 36 gemeinsam berücksichtigt (n = 36) befindet sich im Anhang (A. 10). Die deutlichsten Korrelationen zu den DON-Parametern traten zwischen DON 3 und der Befallshäufigkeit (R = 0,59) und der Fläche unter der Befallskurve auf (R = 0,58), ferner zwischen DON 1 und der Fläche unter der Befallskurve (R = 0,57), der Frischmasse (R = -0,56) und der Befallshäufigkeit (R = 0,54). Alle diese Beziehungen waren höchst signifikant. Letztere Beziehung ist analog zu Versuch 1

(Abb. 3.37) graphisch dargestellt, wobei wiederum die Datenpunkte der beiden Isolate verschieden markiert sind (Abb. 3.42).

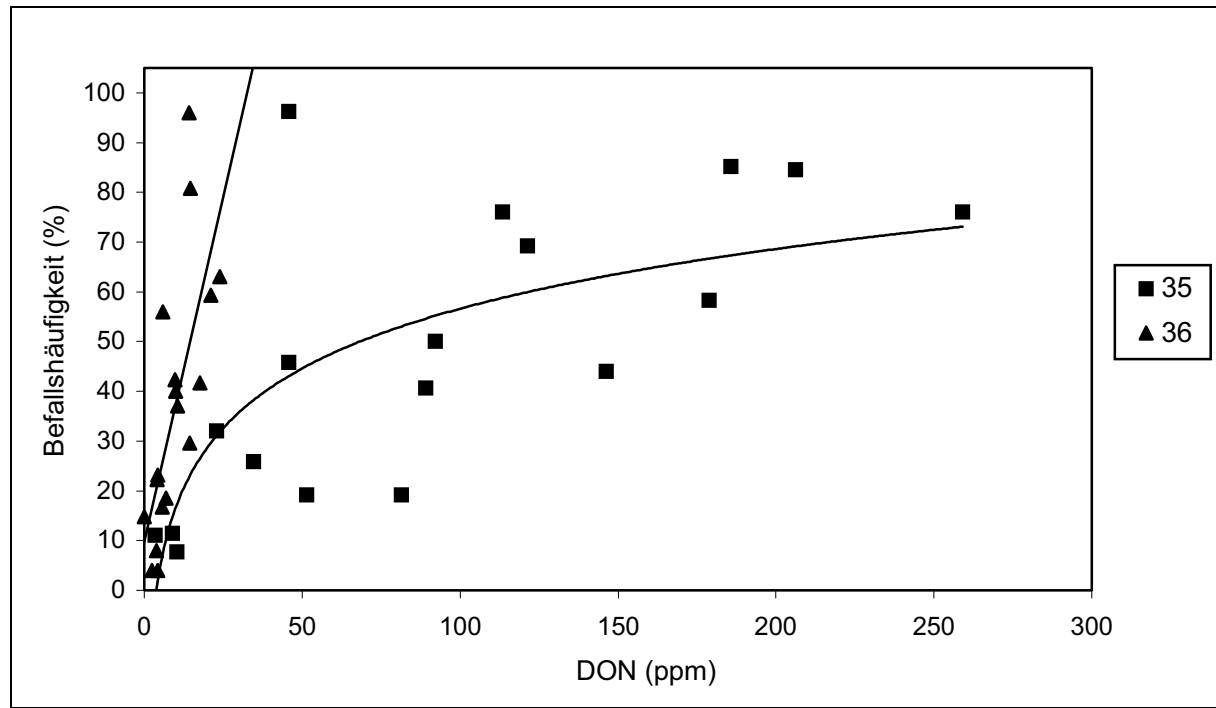


Abbildung 3.42: Korrelation zwischen dem DON-Gehalt ($\text{ppm} \triangleq \text{mg/kg TM (DON 1)}$) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Befallshäufigkeit der Ährchen nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 35 oder Isolat 36 (7 dpi bis 42 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 36 Einzelähren in die Darstellung ein ($n = 36$). Logarithmische Regression (Isolat 35) bzw. lineare Regression (Isolat 36).

Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass sich die Punktwolken der Wertepaare beider Isolate in ihrer Lage und Größe stark voneinander unterscheiden. Wie schon erwähnt, war die Varianz für den DON-Gehalt bei Isolat 36 im Vergleich zu Isolat 35 nur gering. Bei Isolat 36 nämlich war der DON-Gehalt über die ganze Infektionsperiode relativ konstant (max. 18 ppm). Für Isolat 35 variierte der Parameter DON 1 hingegen von 3 bis 228 ppm. Die Befallshäufigkeit hingegen deckte für beide Isolate einen vergleichbaren Bereich ab.

In diesem Versuch wurde wöchentlich neben der Befallshäufigkeit der Ährchen auch die Befallsstärke der Ährchen bonitiert (siehe Abb. 3.39). In Tab. 3.17 wird verglichen, ob die Befallshäufigkeit, die Befallsstärke oder die Fläche unter der Befallskurve die engere Korrelation zu DON 1 liefert.

Tabelle 3.17: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen der Befallshäufigkeit (BH), der Befallsstärke (BS), oder der Fläche unter der Befallskurve (FUBK) und dem DON-Gehalt (DON 1) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 35 oder 36 jeweils einzeln (n = 18) oder gemeinsam (n = 36) (7 dpi bis 42 dpi). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder * ($p < 0,001$). Fettgedruckte Werte: engste Korrelation in jeder Spalte.**

	DON 1		
	Isolat 35 (n=18)	Isolat 36 (n=18)	Isolat 35 und 36 (n=36)
BH	0,70**	0,71***	0,55***
BS	0,72***	0,66**	0,58***
FUBK	0,75***	0,71***	0,57***

Zwischen der Befallshäufigkeit, der Befallsstärke und der Fläche unter der Befallskurve bestanden nur geringe Unterschiede, was die Enge der Korrelation zum Parameter DON 1 betrifft. Für Isolat 35 war die Beziehung von DON 1 zur Fläche unter der Befallskurve am engsten, für Isolat 36 waren die Beziehung zur Fläche unter der Befallskurve und die Befallshäufigkeit gleichwertig. In einer gemeinsamen Betrachtung beider Isolate war die Korrelation zur Befallsstärke am deutlichsten. Aber auch die anderen Korrelationen waren jeweils nur unwesentlich schlechter. Jedenfalls kann nicht generell davon ausgegangen werden, dass die Befallsstärke, die ja eine höhere Auflösung für der Quantifizierung der Symptomausprägung ermöglichte, auch die eindeutigere Korrelation liefert. Welcher Boniturparameter die engere Korrelation liefert, hängt also auch vom Isolat selbst ab. Möglicherweise spielt auch hier eine Rolle, ob die jeweils korrelierten Parameter für ein Isolat etwa gleich stark (Isolat 35) oder verschieden stark variieren (Isolat 36).

3.7.4 Zusammenfassende Betrachtung der ersten und zweiten Ähren-Inokulation und Korrelation zwischen DON-Gehalt und Befall auf Isolat-Ebene

In Versuch 1 wurden die beiden *F. graminearum*-Isolate 34 und 37 mit etwa gleicher Aggressivität und DON-Bildung verwendet, in Versuch 2 die Isolate 35 und 36, die in beiden Parametern deutliche Unterschiede aufwiesen.

Trotz der unterschiedlichen Dauer der Versuche von 63 Tagen (Versuch 1) und 42 Tagen (Versuch 2) waren viele Gemeinsamkeiten zu erkennen.

Der Verlauf der Befallshäufigkeit (Abb. 3.34 und 3.38) war in beiden Versuchen vergleichbar. Allerdings wurden in Versuch 1 wegen der längeren Versuchsdauer Werte von 100 % erreicht, während in Versuch 2 Isolat 35 nach 42 Tagen einen Maximalwert von 82 %. Der Befall der Ähren im zweiten Versuch entwickelte sich im Vergleich zu Versuch 1 außerdem zeitlich verzögert. In Versuch 1 waren nach 42 Tagen nämlich bei beiden Isolaten schon über 90 % der Ährchen befallen. Bei Versuch 2 traten zwischen den beiden Isolaten signifikante Unterschiede auf. Isolat 36 zeigte einen deutlich niedrigeren Befall.

Beim Wassergehalt lag ein vergleichbares Bild vor (Abb. 3.35 und 3.40). In Versuch 2 nahm der Wassergehalt der Ähren im Vergleich zu Versuch 1 analog zum Befallsverlauf leicht verzögert ab. Dann erfolgte eine Abnahme zumindest für Isolat 35 umso abrupter, so dass nach 42 Tagen für alle 4 Isolate der beiden Versuche ein entsprechendes Niveau von 10 bis 15 % Wasser erreicht wurde.

Die Entwicklung des DON-Gehalts (Abb. 3.36 und 3.41) verlief bei Versuch 1 auf einem höheren Level als bei Versuch 2, und auch der Anstieg in den ersten 21 Tagen war deutlich schneller. Der Maximalwert für beide Isolate wurde hier schon nach 21 Tagen erreicht, bei Versuch 2 erst nach 35 Tagen. Bei Versuch 2 trat zwischen den beiden *F. graminearum*-Isolaten 35 und 36 ein deutlicher, teils signifikanter Unterschied auf. Isolat 36 bildete sehr viel weniger DON.

Für alle Isolate in beiden Versuchen bestand eine signifikante Korrelation zwischen DON 1 und der Befallshäufigkeit (Tab. 3.13 - 3.16). Interessanterweise lieferte die Frischmasse bei Isolat 35 die besseren Korrelationen, wie auch schon bei den Isolaten 34 und 37 aus Versuch 1. Bei Isolat 36 lieferte die Trockenmasse die deutlicheren Zusammenhänge. Möglicherweise spielt die Art und Weise, in der der Befall und die Entwicklung des DON-Gehalts verliefen,

DON 1 zeigte zu allen getesteten Parametern einen signifikanten Zusammenhang, ebenso wie DON 3. DON 2 korrelierte nur mit der Trockenmasse signifikant. Den deutlichsten Bezug hatte DON 1 zum Parameter Frischmasse ($R = 0,99$), dicht gefolgt vom Wassergehalt und der Befallshäufigkeit ($R = 0,98$).

Die Frischmasse stand zu beiden Befallsparametern in signifikanter Beziehung, ebenso der Wassergehalt (hoch bzw. höchst signifikant). Nur die Trockenmasse zeigte keine weitere signifikante Korrelation.

In Abb. 3.43 ist die Korrelation zwischen dem Parameter DON 1 und der Befallshäufigkeit für die *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 auf Isolat-Ebene graphisch dargestellt.

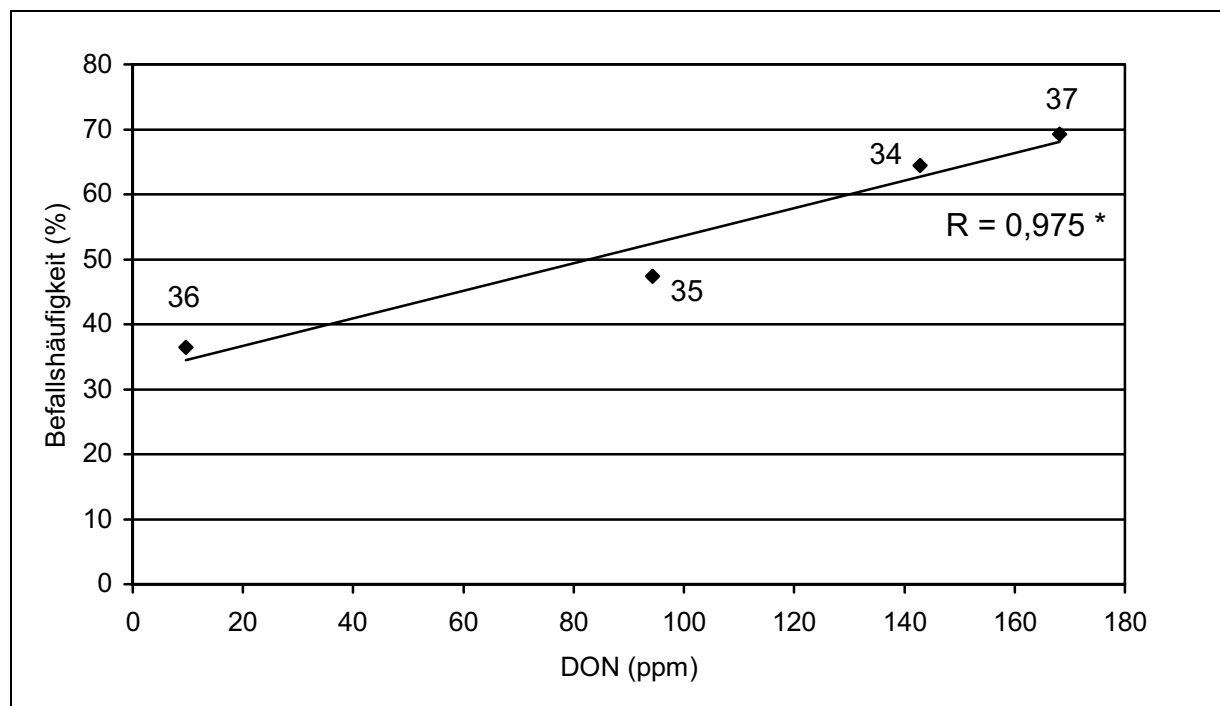


Abbildung 3.43: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Parametern DON 1 (ppm \cong mg/kg TM) und Befallshäufigkeit der Ährchen auf Isolat-Ebene. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein *F. graminearum*-Isolat (Datenbeschriftung). Die Wertepaare sind Mittelwerte aus jeweils 18 Einzelwerten (7 dpi bis 42 dpi). Lineare Regression. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$).

Es ergab sich eine deutliche signifikante Abhängigkeit der beiden Variablen voneinander ($R = 0,975$). Ein *F. graminearum*-Isolat, das einen höheren DON-Gehalt bewirkte, verursachte

auch eine höhere Befallshäufigkeit. Es handelt sich bei der linearen Regression um keine Ursprungsgerade, sondern die y-Achse würde bei einem Wert von 31,3 % geschnitten.

Um die Frage zu klären, zu welchem Zeitpunkt der Pathogenese der Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Symptomausprägung am deutlichsten war, wurde die Korrelation zwischen den Parametern DON 1 und Befallshäufigkeit für die verschiedenen Probenahme-Zeitpunkte getrennt betrachtet. Hierzu wurden die Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelähren für jedes der vier Isolate verwendet (Tab. 3.19).

Tabelle 3.19: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für den Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt (Parameter DON 1) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Befallshäufigkeit der Ährchen auf Isolat-Ebene. Die Ergebnisse (Mittelwerte) der vier Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 4) werden für die Zeitpunkte 7 dpi bis 42 dpi getrennt miteinander korreliert. Jeder der Mittelwerte basiert auf 3 Einzelwerten. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001).

	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi	42 dpi
R	0,953*	0,962*	0,996**	0,861	0,980*	0,985*

Für mehrere Zeitpunkte ergab sich eine enge Korrelation zwischen den Parametern DON 1 und Befallshäufigkeit der Ährchen. Die engste und höchst signifikante Korrelation lag bei 21 dpi mit $R = 0,996$ ($p = 0,00411$) vor. Auch für die Parameter-Kombinationen DON 2/Befallshäufigkeit, DON 2/Fläche unter der Befallskurve und DON 1/Fläche unter der Befallskurve war unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach 21 Tagen die engste Korrelation zu verzeichnen (siehe Anhang A.10).

3.7.5 Dritte Ähren-Inokulation (Isolate 34 - 37)

3.7.5.1 Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts

In Abb. 3.44 ist der Befallsverlauf anhand der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen bis zum Versuchsende nach 63 Tagen dargestellt. Die nicht inokulierten Kontrollähren zeigten, dass in diesem Versuch ab 35 dpi verstärkt Sekundär-Infektionen auftraten.

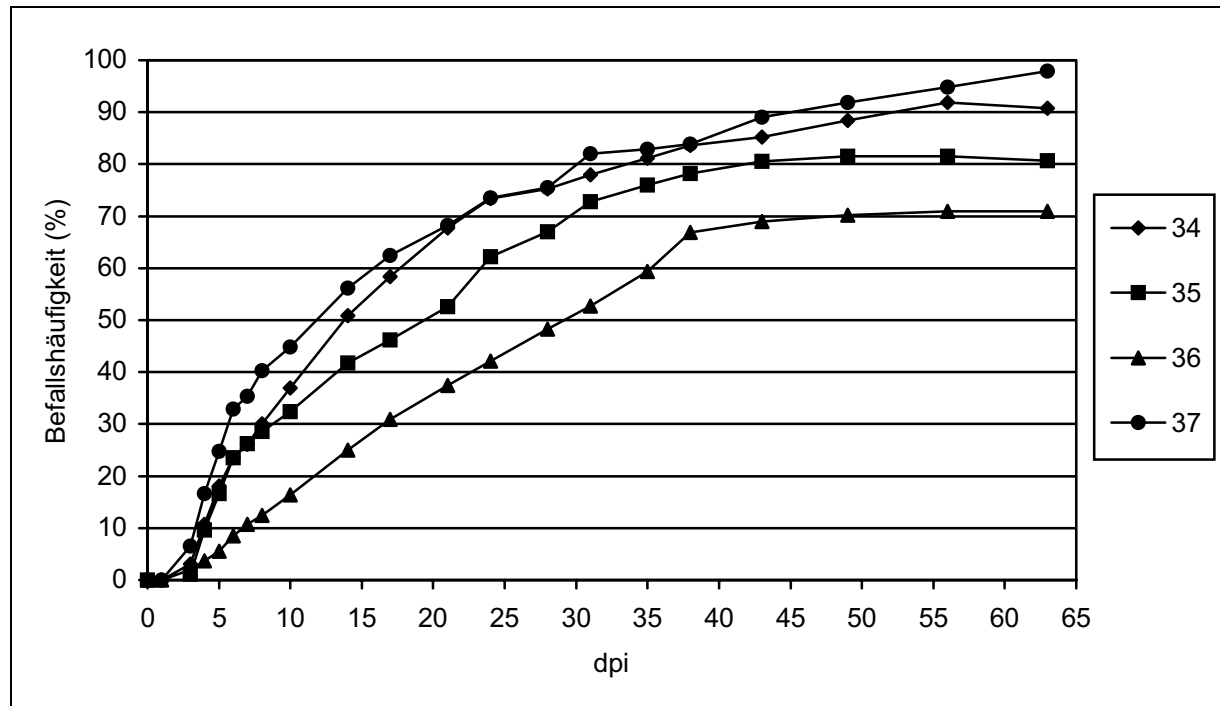


Abbildung 3.44: Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Pico) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 63 dpi in %. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 50$ (0 dpi) bedingt durch die Probennahme auf $n = 13$ (Isolate 35 und 36), $n = 10$ (Isolat 34) oder $n = 9$ (Isolat 37) ab (63 dpi).

Die Befallshäufigkeit zeigte für alle vier Isolate eine sigmoide Entwicklung (Abb. 3.44). Die Isolate 34, 35 und 37 ähnelten sich untereinander stärker, während Isolat 36 einen verzögerten und verringerten Befall zeigte.

Schon zum ersten Bonitur-Termin nach 3 Tagen traten bei allen Isolaten Symptome auf. Für die drei Isolate 34, 35 und 37 stieg der Befall bis etwa 10 dpi sehr stark an, für Isolat 37 beispielsweise von 7 % (3 dpi) auf 45 % (10 dpi). Isolat 36 fehlte dieser fast exponentielle Anstieg zu Beginn der Symptomausprägung. Für Isolat 36 stieg die Befallshäufigkeit in dieser Zeit nur von 2 auf 16 % an.

Ab etwa 7 dpi ging der Befallsverlauf für Isolat 35 in eine fast lineare Phase über (bis etwa 35 dpi), für Isolat 37 von 10 bis 24 dpi. Für Isolat 34 war diese Phase kürzer (etwa 10 bis 24 dpi), aber der Anstieg war umso steiler. Isolat 36 hingegen zeigte einen fast strikt linearen Befallsanstieg bis 35 dpi, um dann einen Höchstwert von etwa 70 % anzustreben (63 dpi).

Nach der eben beschriebenen linearen Anstiegs-Phase gingen alle Isolate in einen Bereich geringerer Steigung über. Isolat 35 erreichte nach 63 Tagen einen Wert von ca. 80 %, Isolat 34 von etwa 90 %. Eine Ausnahme machte Isolat 37, das eine erneute Phase linearen Anstiegs zeigte, wenn auch mit verminderter Steigung. Hier wurde ein Wert von 100 % angestrebt.

Auffällig war, dass fast über den gesamten Befallsverlauf die Rangfolge der einzelnen Isolate konstant war. Isolat 36 war eindeutig am wenigsten aggressiv. Die drei Isolate 34, 35 und 37 lagen insgesamt enger beieinander, aber von diesen drei Isolaten war eindeutig Isolat 35 am schwächsten. Die Isolate 34 und 36 lagen wiederum näher beieinander, aber auch hier ist Isolat 37 stets am aggressivsten.

Tabelle 3.20: Signifikante Unterschiede zum Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 3 dpi bis 63 dpi. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 50$ (3 dpi) bedingt durch die Probennahme auf $n = 13$ (Isolate 35 und 36), $n = 10$ (Isolat 34) oder $n = 9$ (Isolat 37) ab (63 dpi). Mit denselben Buchstaben gekennzeichnete Isolate unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$).

	3	4	5	6	7	8	10	14	17	21	24	28	31	35	38	43	49	56	63
34	b	ab	ab	b	a	b	ab	ab	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab
35	b	bc	b	b	a	b	b	b	b	b	a	a	a	a	ab	ab	ab	ab	ab
36	b	c	c	c	b	c	c	c	c	c	b	b	b	b	b	b	b	b	b
37	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Diese Unterschiede sind auch statistisch absicherbar (Tab. 3.20). So unterschied sich Isolat 36 immer signifikant von Isolat 37, und außer zu 3 dpi und 63 dpi noch von mindestens einem weiteren Isolat. An zwölf der 19 Termine unterschied sich Isolat 36 signifikant von allen drei Isolaten. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten 34, 35 und 37 waren seltener. So unterschieden sich die Isolate 34 und 37 beispielsweise nur zu drei Zeitpunkten signifikant voneinander. Isolat 35 zeigte immerhin zu 9 Terminen signifikante Unterschiede zu Isolat 37 und an zwei Terminen zu Isolat 34.

Zum Vergleich ist hier der Verlauf der mittleren Befallsstärke dargestellt (Abb. 3.45). Diese Bonitur-Methode erzeugte eine etwas höhere Auflösung, konnte aber aufgrund einsetzender Abreife nur bis 35 dpi durchgeführt werden.

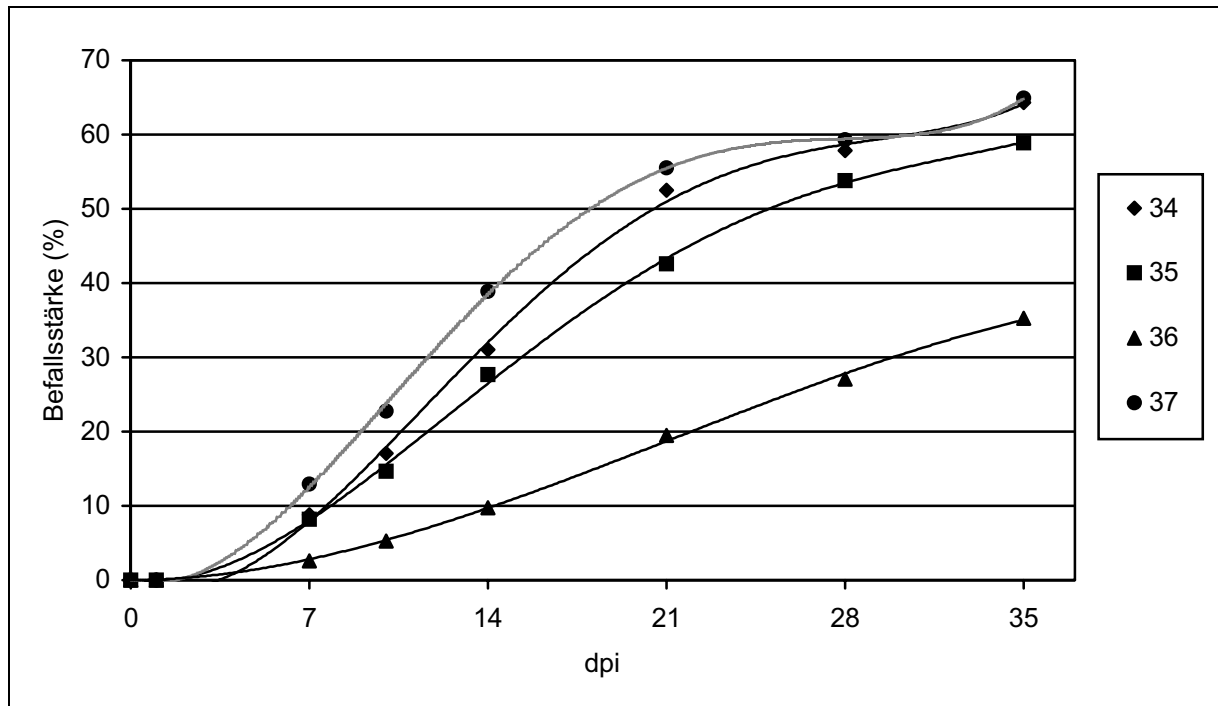


Abbildung 3.45: Verlauf der mittleren Befallsstärke der Ährchen (Sommerweizen Pico-lo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 35 dpi in %. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 50$ (0 dpi) bedingt durch die Probennahme auf $n = 28$ (Isolat 36), $n = 26$ (Isolate 34 und 35) oder $n = 24$ (Isolat 37) ab (35 dpi). Regression: Polynom 3. Grades (Isolat 36) oder Polynom 4. Grades (Isolate 34, 35, 37); helle Linie: Isolat 37.

Die Befallsstärke zeigte insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie die Befallshäufigkeit. Das Niveau lag allerdings boniturbedingt stets 10 bis 20 % unter dem der Befallshäufigkeit. Der Verlauf war abgesehen von Isolat 36 für alle Isolate sigmoid. Der Beginn des Abflachens der Kurve schien bei den Isolaten 34, 35 und 37 schon nach 28 dpi erreicht zu sein, also etwas früher als bei der Befallshäufigkeit. Da die Bonitur aber schon bei 35 dpi endete, könnte es sich auch um ein schwankungsbedingtes Abflachen der Kurven handeln. Isolat 36 zeigte im bonitierten Zeitraum keine Abnahme des Befallsanstiegs.

Auch hier war Isolat 37 über weite Strecken am aggressivsten, gefolgt von Isolat 34 und 35. Isolat 36 war eindeutig am wenigsten aggressiv.

Tabelle 3.21: Signifikante Unterschiede zum Verlauf der mittleren Befallsstärke der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 7 dpi bis 35 dpi. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von n = 44 (7 dpi) bedingt durch die Probennahme auf n = 28 (Isolat 36), n = 26 (Isolate 34 und 35) oder n = 24 (Isolat 37) ab (35 dpi). Mit denselben Buchstaben gekennzeichnete Isolate unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$).

	7 dpi	10 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi	35 dpi
34	b	ab	ab	ab	a	a
35	b	b	b	b	a	a
36	c	c	c	c	b	b
37	a	a	a	a	a	a

Diese Unterschiede waren für Isolat 36 gegenüber allen anderen Isolaten zu allen Terminen signifikant (Tab. 3.21). Isolat 37 unterschied sich an vier der sechs Termine von mindestens einem der Isolate 34 und 35 signifikant.

Zu 7 dpi zeigte der Parameter Befallsstärke deutlichere signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten als der Parameter Befallshäufigkeit (Tab. 3.20), zu 21 dpi lieferte die Befallshäufigkeit die eindeutigeren Unterschiede. Von einer Überlegenheit des Parameters Befallsstärke kann zumindest in dieser Hinsicht nicht gesprochen werden.

Auf eine Darstellung der Entwicklung des Wassergehalts wurde verzichtet, da sich daraus im Vergleich zu den Ähren-Inokulationen 1 und 2 keine neuen Erkenntnisse ergaben (Abb. 3.35 und Abb. 3.40).

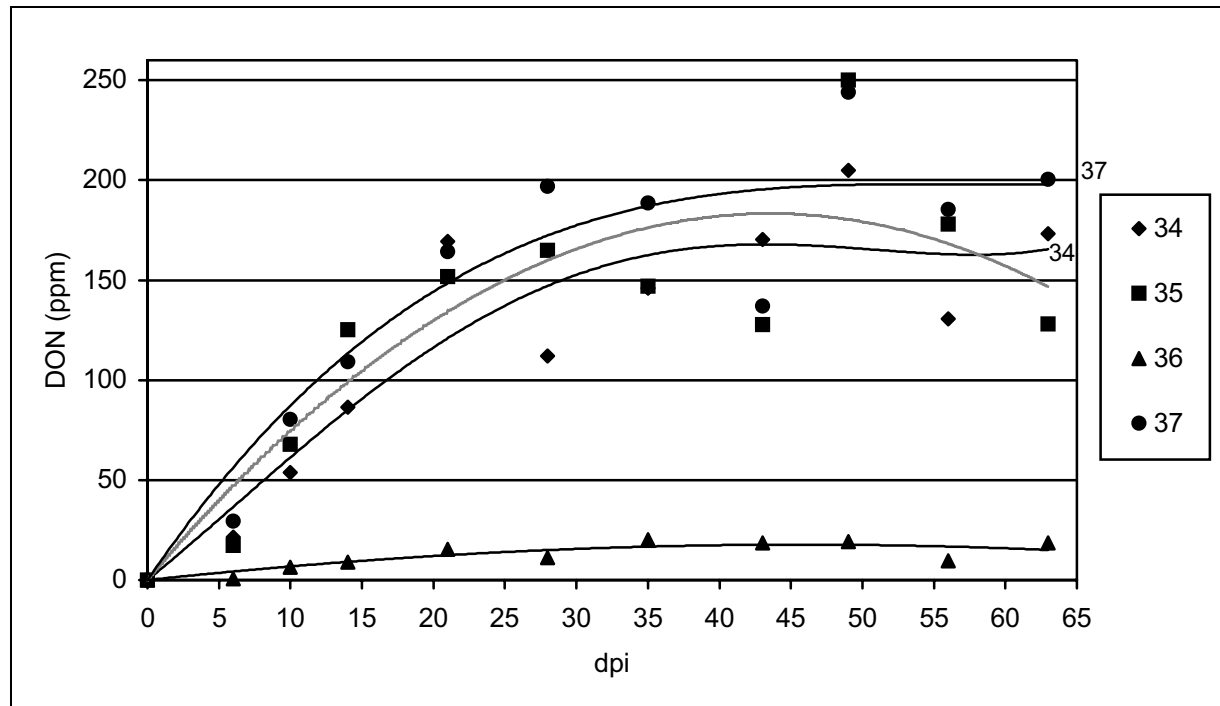


Abbildung 3.46: Entwicklung des DON-Gehalts (ppm \triangleq mg/kg TM (DON 1)) ganzer Ähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 63 dpi in ppm. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 (n=3). Bei 63 dpi wurden statt 3 Einzelähren pro Isolat 3 Mischproben verwendet, die ihrerseits aus 3 bis 5 Einzelähren bestanden. Regression (teilweise beschriftet): Polynom 2. Grades (Isolat 35), Polynom 3. Grades (Isolate 36 und 37) bzw. Polynom 4. Grades (Isolat 34); helle Linie: Isolat 35.

Die Entwicklung des DON-Gehalts (DON 1, Abb. 3.46) der Weizenähren zeigte ein vergleichbares Bild wie der Befallsverlauf (Abb. 3.44), was aber durch die starke Steigung einer polynomischen Regression in frühen Stadien hinsichtlich einer Anlaufphase nicht gut angenähert werden konnte. Schon nach 6 Tagen konnte bei allen Isolaten DON nachgewiesen werden. Der Nachweis von DON war qualitativ sogar schon nach 3 Tagen möglich (fehlende Werte durch Verlust von Proben). Bis 21 dpi stieg der DON-Gehalt für alle vier Isolate linear an. Für Isolat 36 lag aber mit 15 ppm ein sehr viel niedrigeres Niveau vor als für die drei übrigen Isolate (ca. 125 bis 150 ppm). Insgesamt zeichnete sich aber trotz relativ starker Schwankungen ein Abflachen der Kurven ab. Der DON-Gehalt erreichte nach 63 Tagen schließlich Endwerte von etwa 200 ppm (Isolat 37), 170 ppm (Isolat 34), 150 ppm (Isolat 35) und 19 ppm (Isolat 36).

Isolat 36 bildete eindeutig am wenigsten DON. Klare Unterschiede zwischen den Isolaten 34, 35 und 37 lagen über weite Strecken nicht vor. Eine durch die Regressionen angedeutete Tendenz zeigte, dass Isolat 37 am meisten DON bildete, gefolgt von den Isolaten 35 und 34. Aber dieser Unterschied zwischen den Isolaten 35 und 34 war über die Zeit nicht konsistent.

Tabelle 3.22: Signifikante Unterschiede im DON-Gehalt (DON 1) der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 6 dpi bis 56 dpi. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 3). Mit denselben Buchstaben gekennzeichnete Isolate unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$).

	6	10	14	21	28	35	43	49	56
34	a	ab	ab	a	ab	a	a	a	a
35	ab	a	a	a	a	a	a	a	a
36	b	b	b	b	b	a	a	b	a
37	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Auch Tab. 3.22 zeigt, dass die teils großen Unterschiede in den Mittelwerte nicht immer notwendigerweise auch in signifikanten Unterschieden resultieren (35 dpi, 43 dpi, 56 dpi). Isolat 36 unterschied sich aber doch in sechs von neun Fällen von mindestens einem der Isolate (Isolat 37) signifikant. Zwischen den drei *F. graminearum*-Isolaten 34, 35 und 37 traten hingegen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf.

Zusammenfassend ist wiederum zu sagen, dass hinsichtlich der Aggressivität und der DON-Bildung zwischen Isolat 36 (geringe Aggressivität, schwacher DON-Bildner) und den drei Isolaten 34, 35 und 36 deutliche und zum großen Teil signifikante Unterschiede auftraten. Der Unterschied im DON-Gehalt der Ähren ist aber größer (Mittelwerte) als in der Befallshäufigkeit, wenn auch seltener signifikant. Die Unterschiede zwischen den Isolaten 34, 35 und 37 untereinander sind beim Befall teils signifikant (Isolat 37 am aggressivsten), aber sonst nur tendenzieller Natur (DON-Gehalt).

3.7.5.2 Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern

auf Ebene der Einzelähren

In diesem Abschnitt sollen nun die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Parametern des DON-Gehalts, den eher physikalischen Parametern (FM, TM, Wassergehalt) und den Befallsparametern verdeutlicht werden. Da die Korrelationen für die Isolate 34 bis 37 einzeln betrachtet vergleichbare Ergebnisse wie in Versuch 1 und 2 (Tab. 3.14-3.17) lieferten, wird hier nur eine Korrelationstabelle für die Einzelähren aller Isolate gemeinsam weiter unten gezeigt (Tab. 3.23) und die Ergebnisse für die einzelnen Isolate in Kürze zusammengefasst.

Wie schon in Versuch 1 und 2 zeigte sich bei den Isolaten 34 bis 37 einzeln betrachtet eine signifikante Beziehung zwischen DON 1 und DON 3 auf der einen Seite und der Befallshäufigkeit bzw. der Fläche unter der Befallskurve auf der anderen Seite. DON 2 zeigte bei keinem der Isolate eine signifikante Beziehung zu einem der Befallsparameter. Insgesamt betrachtet sind die Korrelationen zwischen DON und Befallsparametern in diesem dritten Versuch enger als in Versuch 1 oder 2, vor allem bei Isolat 37. Isolat 37 zeigt in diesem Versuch 3 deutlichere Ähnlichkeit zu den Isolaten 34 und 35 als in den Versuchen 1 und 2. Auch hier gilt wieder, dass sich die Isolate 34, 35 und 37 in ihren Korrelationen ähnlicher sind als Isolat 36. Deutlich wird das daran, dass die Isolate 34, 35 und 37 signifikante Korrelationen zwischen der Frischmasse der Ähren und den Befallsparametern aufweisen, in keinem Fall für die Trockenmasse. Diese Signifikanzen sind bei Isolat 36 für die Trockenmasse und die Frischmasse vorhanden, aber für die Trockenmasse z. T. (gegenüber BH) auf einem höheren Signifikanz-Niveau. In Versuch 1 und 2 waren bei Isolat 36 diese Korrelationen nur für die Trockenmasse signifikant.

Tabelle 3.23: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 (6 dpi bis 56 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 107 Einzelähren in die Berechnung ein (n = 107). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge (µg/Ähre).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,91***	0,87***	-0,67***	-0,36***	-0,49***	0,61***	0,60***
2	DON 2		0,81***	-0,48***	-0,41***	-0,22*	0,35***	0,33***
3	DON 3			-0,43***	-0,02	-0,48***	0,60***	0,52***
4	Frischmasse (FM)				0,50***	0,67***	-0,69***	-0,73***
5	Trockenmasse (TM)					-0,26**	0,10	0,03
6	Wassergehalt (WG)						-0,84***	-0,89***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,85***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Diese Korrelationstabelle (Tab. 3.22), die die Einzelwerte aller vier Isolate berücksichtigt, zeigt fast ausschließlich signifikante Beziehungen und liefert eine gute Zusammenfassung der bisherigen Einzelergebnisse.

Die engste Korrelationen für DON 1 bestand zur Frischmasse (R = -0,67), der Befallshäufigkeit (R = 0,61) und der Fläche unter der Befallskurve (R = 0,60) (jeweils höchst signifikant).

Auch DON 2 zeigte höchst signifikante Beziehungen, aber mit deutlich schwächerem Korrelationskoeffizienten (R = -0,48 für Frischmasse).

DON 3 hingegen lag mit R = 0,60 bei der Befallshäufigkeit auf einem ähnlichen Niveau wie DON 1.

Die Frischmasse korrelierte höchst signifikant mit beiden Befallsparametern, mit einem Maximum von R = -0,73 bei der Fläche unter der Befallskurve.

Auch der Wassergehalt wies hier höchst signifikante Beziehungen auf ($R = -0,89$ bei der Fläche unter der Befallskurve).

Die Trockenmasse zeigte zu den Befallsparametern keine signifikante Beziehung.

Auffällig ist, dass die Korrelation zwischen DON 1 und FUBK für alle Isolate einzeln betrachtet enger war als zwischen DON 1 und BH, aber dass in der gemeinsamen Betrachtung (Tab. 3.23) die Beziehung zwischen DON 1 und BH die engere war.

Die zusammenfassenden Ergebnisse in Tab. 3.23 werden stark geprägt von den Isolaten 34, 35 und 37, die starke Beziehungen zwischen den Parametern DON 1 und DON 3 einerseits und andererseits BH, FUBK, FM und WG aufwiesen. Ebenso gab es starke Korrelationen zwischen den Parametern FM und WG mit den Befallsparametern. Nur Isolat 36 wies viele Korrelationen mit dem Parameter TM auf, nicht so die anderen Isolate. Auch das spiegelte sich in wenigen Korrelationen für den Parameter TM in dieser zusammenfassenden Tabelle wieder.

Die wichtigen Beziehungen zwischen DON 1 und der Befallshäufigkeit bzw. der Fläche unter der Befallskurve sind in Abb. 3.47 und Abb. 3.48 graphisch dargestellt. Die Datenpunkte der vier Isolate sind zur Unterscheidung verschieden markiert.

Auch hier (Abb. 3.47) wird der Unterschied zwischen den Isolaten 34, 35 und 37 auf der einen und dem Isolat 36 auf der anderen Seite deutlich. Die Bereiche, die von den Datenpunkten der Isolate 34, 35 und 37 abgedeckt werden, unterschieden sich in Größe und Lage kaum voneinander. Eine logarithmische Regression lieferte eine gute Annäherung an diese Punktwolken. Während die Befallshäufigkeit hier einem Höchstwert entgegenstrebte, schwankte der DON-Gehalt über einen Bereich von 100 ppm bis 350 ppm. Für Isolat 36 variierte der Faktor DON 1 nur von 0 bis maximal 36 ppm, wobei die Befallshäufigkeit eine ähnlich große Spannbreite hatte wie für die drei übrigen Isolate (max. 86 %). Hieraus ergab sich eine andere Größe und Lage der Punktwolke für Isolat 36. Die Punkte liegen in einem schmalen Bereich dicht an der y-Achse. Als Regression wurde hier eine exponentielle Funktion gewählt.

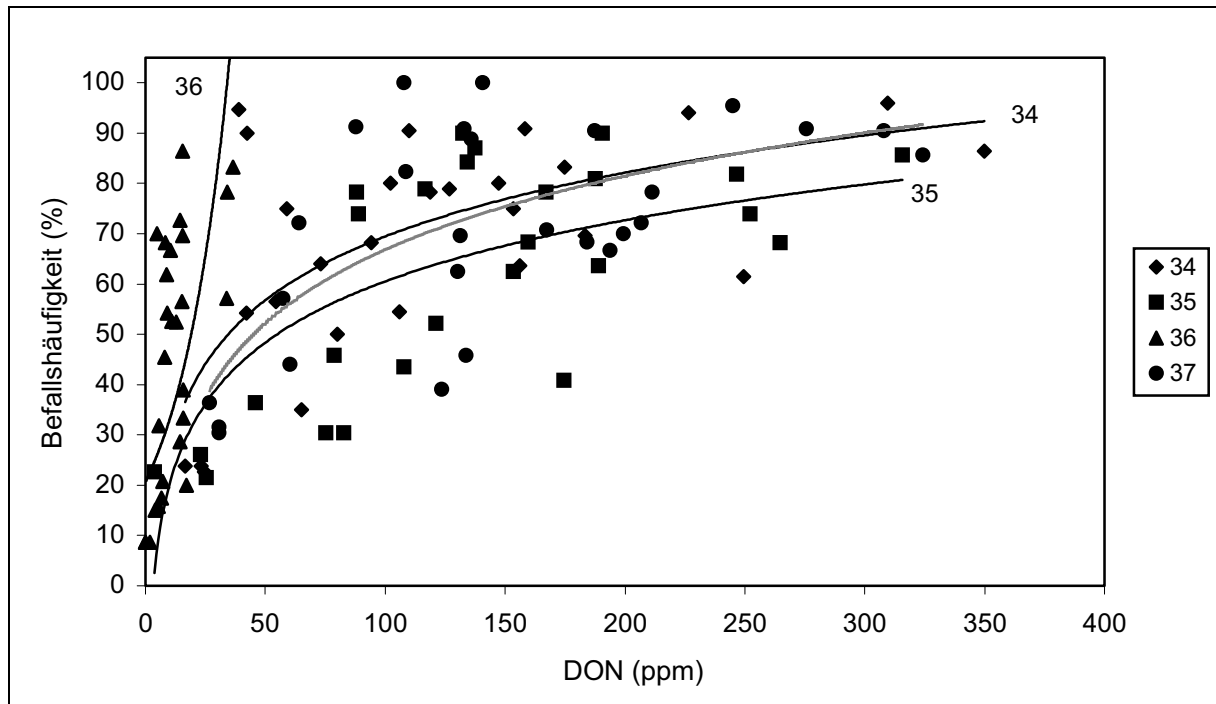


Abbildung 3.47: Korrelation zwischen dem DON-Gehalt ($\text{ppm} \triangleq \text{mg/kg TM (DON 1)}$) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Befallshäufigkeit der Ährchen nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 (6 dpi bis 56 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 107 Einzelähren in die Darstellung ein ($n = 107$). Logarithmische (Isolate 34, 35 und 37) bzw. exponentielle Regression (Isolat 36). Regressionen teilweise beschriftet. Helle Linie = Isolat 37.

Auch für eine Darstellung der Parameter DON 1 und Fläche unter der Befallskurve unterschieden sich die Punktwolken der Wertepaare für die Isolate 34, 35 und 37 weder in der Lage noch in der Größe (Abb. 3.48). Die Wertepaare für Isolat 36 lagen wiederum in einem schmalen Bereich entlang der y-Achse. Denn auch für den Parameter Fläche unter der Befallskurve variieren die Werte von Isolat 36 verglichen mit den Werten für DON 1 überproportional stark. Als Regression wurde hier für alle Isolate eine exponentielle Funktion gewählt.

Tab. 3.24 stellt die Korrelation von DON 1 mit Befallshäufigkeit, Befallsstärke oder Fläche unter der Befallskurve gegenüber.

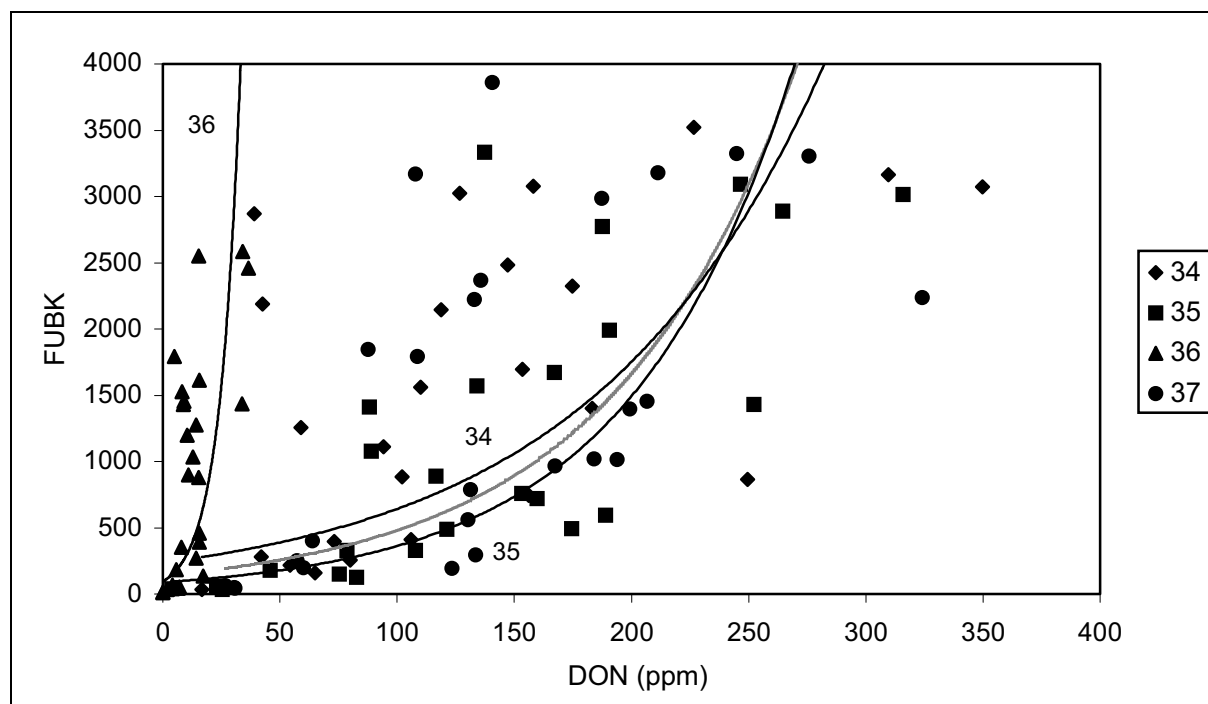


Abbildung 3.48: Korrelation zwischen dem DON-Gehalt ($\text{ppm} \triangleq \text{mg/kg TM (DON 1)}$) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Fläche unter der Befallskurve nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 (6 dpi bis 56 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 107 Einzelähren in die Darstellung ein ($n = 107$). Exponentielle Regression. Regressionen z. T. beschriftet. Helle Linie = Isolat 37.

Tabelle 3.24: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen der Befallshäufigkeit (BH), der Befallsstärke (BS) oder der Fläche unter der Befallskurve (FUBK) und dem DON-Gehalt (DON 1) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 jeweils einzeln ($n=15$) oder gemeinsam ($n = 60$) (10 dpi bis 35 dpi). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder * ($p < 0,001$).**

	DON 1				
Isolat	34	35	36	37	34, 35, 36, 37
n	15	15	15	15	60
BH	0,32	0,56*	0,51*	0,44	0,62***
BS	0,65**	0,60*	0,61*	0,75**	0,75***
FUBK	0,54*	0,62*	0,69**	0,65**	0,57***

Was die Enge der Korrelation zum Parameter DON 1 betrifft, bestanden zwischen den drei Befallsparametern BH, BS und FUBK teils beträchtliche Unterschiede. In der Tabelle wurde nur der Bereich von 10 dpi bis 35 dpi betrachtet, da nur in diesem Zeitraum die Befallsstärke bonitiert wurde. Für zwei der Isolate lieferte die Befallsstärke die engste Korrelation (Isolate 34 und 37, für die Isolate 35 und 36 korrelierte die Fläche unter der Befallskurve am besten mit DON 1. Insgesamt lieferte die Befallsstärke die beste Korrelation. Die Korrelation zwischen der Befallshäufigkeit und DON 1 war immer die schlechteste und nur in zwei Fällen signifikant.

3.7.5.3 Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befall auf Isolat-Ebene

In Tab. 3.25 wurde dargestellt, welche Korrelationen auf Isolat-Ebene bestehen. Als Datengrundlage dienten die Mittelwerte der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 für die jeweiligen Parameter ($n = 4$). Jeder dieser Mittelwerte beruht auf den Einzelwerten der jeweils 26 (Isolat 35) oder 27 (Isolate 34, 36, 37) Einzelähren, die von 6 bis 56 dpi für jedes der Isolate untersucht wurden.

Der Parameter DON 1 korrelierte signifikant bzw. hoch signifikant mit der Frischmasse, der Trockenmasse und dem Wassergehalt. DON 2 zeigte nur zu FM und TM eine hoch signifikante Beziehung, während DON 3 zu FM, TM und der Befallshäufigkeit eine signifikante Beziehung aufwies. Auffälligerweise zeigte weder DON 1 noch DON 2 zu einem der Befallsparameter eine signifikante Beziehung, wenn über den gesamten Befallszeitraum gemittelt wurde wie in Tab. 3.25 geschehen.

Frischmasse, Trockenmasse und Wassergehalt korrelierten mit keinem weiteren Parameter signifikant.

In Abb. 3.49 ist die Korrelation zwischen dem Parameter DON 1 und der Befallshäufigkeit bzw. der Fläche unter der Befallskurve für die *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 auf Isolat-Ebene graphisch dargestellt.

Die beiden Parameter DON 1 und BH zeigten einen klaren Zusammenhang ($R = 0,93$), der aber relativ knapp nicht signifikant war ($p = 0,066$). Auch in diesem Versuch ist offenbar ein Isolat, das einen höheren DON-Gehalt verursacht, auch aggressiver.

Tabelle 3.25: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation (6 dpi bis 56 dpi) auf Isolat-Ebene. Die Ergebnisse (Mittelwerte) der vier Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 4) werden miteinander korreliert. Jeder der Mittelwerte basiert auf 26 (Isolat 35) oder 27 (Isolate 34, 36, 37) Einzelwerten. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge (µg/Ähre).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,99*	0,996**	-0,99**	-0,98*	-0,95*	0,93	0,90
2	DON 2		0,98*	-0,99**	-0,99**	-0,93	0,88	0,83
3	DON 3			-0,99*	-0,97*	-0,94	0,96*	0,93
4	Frischmasse (FM)				0,99**	0,92	-0,91	-0,87
5	Trockenmasse (TM)					0,88	-0,87	-0,82
6	Wassergehalt (WG)						-0,89	-0,89
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,99**
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Dasselbe galt für den Parameter Fläche unter der Befallskurve (Sekundär-Achse), was am nahezu parallelen Verlauf der beiden Regressionen zu erkennen ist. Diese Korrelation war relativ deutlich nicht signifikant (R = 0,098). Die beiden Regressionen waren wiederum keine Ursprungsgeraden, sondern würden die y-Achse bei 43,5 % (BH) bzw. bei 843 (FUBK) schneiden, was für eine Rest-Aggressivität auch eines solchen Isolats spricht, das kein Toxin bildet.

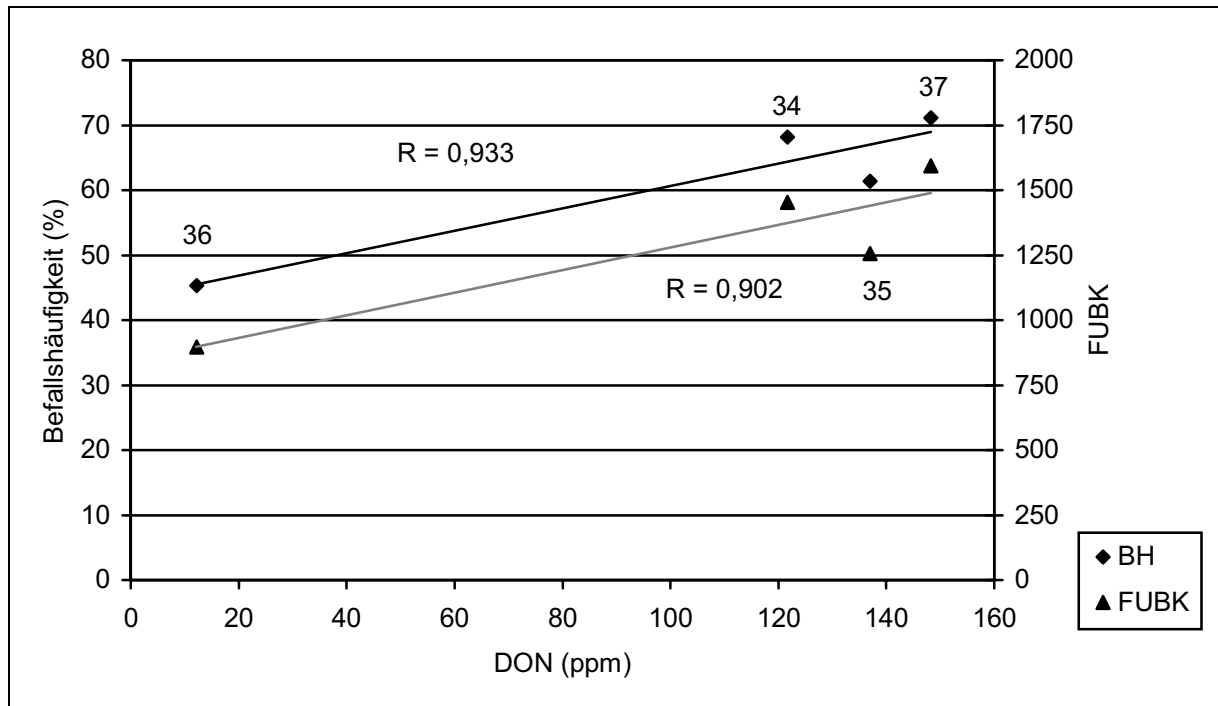


Abbildung 3.49: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Parametern DON 1 und Befallshäufigkeit bzw. Fläche unter der Befallskurve der Ährchen auf Isolat-Ebene. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein *F. graminearum*-Isolat (Datenbeschriftung). Die Wertepaare sind Mittelwerte aus jeweils 26 (Isolat 35) oder 27 (Isolate 34, 36, 37) Einzelwerten (6 dpi bis 56 dpi). Lineare Regression. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$). Helle Linie: Parameter Fläche unter der Befallskurve.

Ein entsprechender Test (Tab. 3.25) von DON 1 gegen BH, FUBK und die Befallsstärke (alle drei Mittelwerte nur auf den Einzelwerten von 10 bis 35 dpi basierend) zeigte für BS und DON 1 einen signifikanten Zusammenhang ($p = 0,047$), nicht aber für BH und DON 1 ($p = 0,056$) oder FUBK und DON 1 ($p = 0,111$) (Tab. 3.26).

Auch für diesen Ährenversuch wurde die Korrelation zwischen den Parametern DON 1 und BH, BS, oder FUBK für die verschiedenen Probenahme-Zeitpunkte getrennt betrachtet, um die Frage zu klären, zu welchem Zeitpunkt der Pathogenese der Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Symptomausprägung am deutlichsten war. Hierzu wurden die Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelähren für jedes der vier Isolate verwendet (Tab. 3.27).

Tabelle 3.26: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (DON 1) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und drei Befallsparametern (BH, BS, FUBK) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation (10 dpi bis 35 dpi) auf Isolat-Ebene. Die Ergebnisse (Mittelwerte) der vier Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 4) werden miteinander korreliert. Jeder der Mittelwerte basiert auf 15 Einzelwerten. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001).

	BH	BS	FUBK
DON 1	0,94	0,95*	0,89

Tabelle 3.27: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für den Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt (Parameter DON 1) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Befallshäufigkeit, der Befallsstärke und der Fläche unter der Befallskurve der Ähren auf Isolat-Ebene. Die Ergebnisse (Mittelwerte) der vier Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 4) werden für die Zeitpunkte 6 dpi bis 56 dpi getrennt miteinander korreliert. Jeder der Mittelwerte basiert auf 3 Einzelwerten (Isolat 35, 43 dpi: 2 Einzelwerte). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). - = Wert nicht vorhanden. Fettgedruckte Werte: engste Korrelation in jeder Zeile.

	DON 1								
dpi	6	10	14	21	28	35	43	49	56
BH	0,989*	0,788	0,895	0,942	0,887	0,985*	0,874	0,877	0,822
BS	-	0,931	0,874	0,95*	0,891	0,964*	-	-	-
FUBK	0,987*	0,852	0,988*	0,846	0,854	0,859	0,931	0,972*	0,959*

Die Korrelation zwischen DON 1 und der Befallshäufigkeit war nach 6 Tagen und nach 35 Tagen signifikant. Für DON 1 und die Befallsstärke ergab sich nach 21 und 35 Tagen eine signifikante Beziehung. Die meisten Signifikanzen wies eine Korrelation von DON 1 mit der Fläche unter der Befallskurve auf (zu 6 dpi, 14 dpi, 49 dpi, 56 dpi).

Zu welchem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen dem DON-Gehalt und der Symptomausprägung am zuverlässigsten ist, hing in diesem Versuch stark von der Wahl der verwendeten

Parameter ab. Dieser Eindruck wird durch eine Korrelation der Parameter DON 2 und DON 3 jeweils mit BH, BS und FUBK bestätigt (siehe Anhang A.10). Hier war ebenfalls kein klarer Trend zu einem bestimmten Zeitpunkt zu beobachten.

Insgesamt lagen die jeweils engsten Korrelationen für die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten unter den gegebenen Versuchsbedingungen vor allem bei 35 dpi und 21 dpi.

3.7.6 Vergleich von Ähren-Inokulation 1 und 2 mit Ähren-Inokulation 3

Da in den drei Versuchen mit denselben *F. graminearum*-Isolaten gearbeitet wurde, erscheint es angemessen, die Versuche miteinander zu vergleichen. In der ersten Ähren-Inokulation wurden die Isolate 34 und 37 verwendet, in der zweiten die Isolate 35 und 36 und in der dritten alle vier Isolate gemeinsam. Im Anhang (A.10) sind die Verläufe der Befallshäufigkeit und des DON-Gehalts (DON 1) der Versuche 1 und 2 zur besseren Übersichtlichkeit nochmals gemeinsam in zwei Diagrammen dargestellt.

Der Verlauf der Befallshäufigkeit wies in allen Versuchen Ähnlichkeiten auf (Abb. 3.34, Abb. 3.38 und Abb. 3.44). Der Verlauf war in Versuch 1 und Versuch 3 leicht sigmoid und strebte einem Höchstwert auf unterschiedlichem Niveau entgegen. Versuch zwei zeigte eine andere Form des Verlaufs. Die Isolate 34, 35 und 37 ähnelten sich vom Befalls-Niveau her in starkem Maße, während der Befall für Isolat 36 sowohl verzögert verlief als auch schwächer blieb. Auch für die übrigen drei Isolate war die Rangfolge in der Befallshäufigkeit reproduzierbar. Isolat 37 war am aggressivsten, gefolgt von den Isolaten 34 und 35.

Die Befallsstärke (Abb. 3.39 und Abb. 3.45) wurde nur in Versuch 2 und 3 bonitiert. Auch hier war Isolat 36 in beiden Fällen das Isolat mit der geringsten Aggressivität. Der Verlauf selbst unterschied sich leicht. Während der Verlauf in Versuch 3 schon nach 21 Tagen einen Höchstwert anstrebte, war in Versuch 2 (Isolate 35 und 36) auch nach 42 Tagen immer noch ein linearer Anstieg zu verzeichnen.

Der Wassergehalt der Ähren im Verlauf der Pathogenese wurde nur für Versuch 1 und 2 wiedergegeben (Abb. 3.35 und Abb. 3.40), da die Ähnlichkeit zu Versuch 3 sehr groß war. Verglichen mit der Kontrolle nahm der Wassergehalt der infizierten Ähren früher und schneller ab. Zwischen den einzelnen Isolaten waren tendenzielle Unterschiede zu erkennen, wobei das weniger aggressive Isolat 36 auch eine verzögerte Wasserabnahme zeigte.

Auch der Verlauf des DON-Gehalts (DON 1) wies generelle Gemeinsamkeiten auf (Abb. 3.36, Abb. 3.41 und Abb. 3.46). Hier war eine Kinetik mit angestrebtem Höchstwert bis leichter tendenzieller Abnahme zum Ende des Versuchs zu erkennen. Nach einer kurzen Anlaufphase, die mangels geeigneter Regression oder fehlender früher Messpunkte nur in Abb. 3.44 deutlich wurde, und einem linearen Anstieg bis etwa 21 dpi traten mehrfach (Versuch 1 und 3) Schwankungen zwischen den Versuchstagen auf. Auch hier setzte sich Isolat 36 als vergleichsweise schwacher DON-Bildner reproduzierbar von den übrigen drei *F. graminearum*-Isolaten ab. Die Rangfolge innerhalb der übrigen drei Isolate war in keinem der Versuche

über den gesamten Zeitraum konsistent. Tendenziell ließ sich jedoch erkennen, dass Isolat 37 offenbar in beiden Fällen den stärksten DON-Gehalt verursachte.

Auch für die Korrelationstabellen zeigte sich für beide Versuchs-Durchführungen ein vergleichbares Ergebnis (Tab. 3.13 - 3.16, 3.18, 3.23). Stets war eine enge und meist signifikante Korrelation zwischen DON 1 und / oder DON 3 auf der einen und BH und / oder FUBK auf der anderen Seite festzustellen. Isolat 36 zeichnete sich durch weniger enge Korrelationen insgesamt, aber durch eine engere Korrelation einiger Parameter (BH, FUBK) zur Trockenmasse als zur Frischmasse aus.

Dass die Befallsstärke generell der geeignetere Parameter ist (verglichen mit BH), wenn es um eine Korrelation zwischen DON-Gehalt und dem Befall geht (Ergebnis aus Versuch 3, Tab. 3.24), konnte durch Versuch 2 nicht bestätigt werden (Tab. 3.18). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass durch die Bonitur bedingt in Versuch 3 der Zeitraum von 10 bis 35 dpi, in Versuch 2 der Zeitraum von 7 bis 42 dpi untersucht wurde. Die Verrechnung der Daten auf Isolat-Ebene (Tab. 3.19 und Tab. 3.27) konnte nämlich zeigen, dass die Qualität einer Korrelation vom Zeitpunkt der Probennahme abhängen kann. Allerdings war der Befund, dass der Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Befall nach 21 Tagen am deutlichsten ist, in Versuch 3 nicht absicherbar, möglicherweise durch versuchsbedingte Einflüsse. Lediglich die deutlichsten Korrelationen zwischen diesen beiden Parameter-Gruppen lagen in Versuch 3 bei 21 oder 35 dpi.

Die Korrelierung des DON-Gehalts mit dem Befall auf Isolat-Ebene zeigte leichte Unterschiede. Für Versuch 1 und 2 zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen DON 1 und DON 3 auf der einen und BH bzw. FUBK auf der anderen Seite (Tab. 3.18). Offensichtlich produzierte ein aggressiveres Isolat auch mehr DON, was sich dann auch in der graphischen Darstellung zeigte (Abb. 3.43). Für Versuch 3 war nur der Zusammenhang zwischen DON 3 und BH signifikant (Tab. 3.25). Auch die lineare Regression (Abb. 3.49) war daher weniger deutlich als für die Daten aus Versuch 1 und 2. Auffällig war, dass es sich um keine Ursprungsgerade handelte, sondern die y-Achse bei einem Wert von 31 bzw. 44 % BH (je nach Versuch) geschnitten wurde.

3.7.7 Auswertung der Proben 63 dpi der 3. Ähren-Inokulation

Zu Versuchsende wurden die Ähren des dritten Ährenversuchs wie unter 2.7.2.3 beschrieben einzeln untersucht. Die Ähren wurden in die Fraktionen Spindeln, Spelzen und Körner aufgeteilt. Für jede Ähre wurden die Frischmasse, Trockenmasse (auch separat für Körner, Spelzen, Spindel), Gesamtzahl der Körner, der prozentuale Anteil ausgebildeter Körner, der Anteil unbefallener, schwach befallener und stark befallener Körner und die Korngrößenverteilung bestimmt. Am Ende wurden jeweils drei bis fünf Ähren vereinigt und getrennt nach Körnern, Spelzen und Spindeln auf den DON-Gehalt untersucht. Zum Vergleich wurden nicht inokulierte Kontroll-Ähren analysiert.

3.7.7.1 Ertrag und Befall

Die Gesamtzahl der Körner pro Ähre (Tab. 3.28), also die Summe aus nicht ausgebildeten und ausgebildeten Körnern, war für alle Isolate nahezu identisch.

Tabelle 3.28: Gesamtzahl der Körner pro Ähre, Kornmasse pro Ähre (TM in g) und Tausendkornmasse (TM in g) (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation (Ernte 63 dpi). Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 mit der nicht inokulierten Kontrolle. Die Daten beruhen auf allen Körnern, unabhängig vom Grad der Ausbildung. Mittelwerte \pm Standardabweichung gefolgt vom gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($\alpha = 0,05$, $LSD^1 = 10,4$, $LSD^2 = 0,55$, $LSD^3 = 9,3$).

		Kontrolle	34	35	36	37
	n	17	10	13	13	9
1	Kornzahl / Ähre	50,7 \pm 7,8 a	46,8 \pm 9,7 a	46,2 \pm 8,6 a	49,5 \pm 9,9 a	48,1 \pm 9,2 a
2	Kornmasse / Ähre	1,79 \pm 0,66 a	0,74 \pm 0,28 b	0,80 \pm 0,40 b	1,45 \pm 0,51 a	0,49 \pm 0,21 b
3	Tausendkornmasse	34,7 \pm 9,5 a	15,8 \pm 5,5 b	17,0 \pm 7,9 b	29,9 \pm 9,3 a	10,3 \pm 4,7 b

Für die Kornmasse pro Ähre und die Tausendkornmasse wurden ebenfalls die nicht ausgebildeten und die ausgebildeten Körner miteinbezogen. Bei der Kornmasse pro Ähre traten deutliche signifikante Unterschiede auf, und zwar war die Kornmasse pro Ähre bei der Kontrolle

und Isolat 36 (1,45 g) höher als bei den Isolaten 34, 35 und 37. Ebenso war die Tausend-kornmasse der Kontrolle und von Isolat 36 (29,9 g) signifikant größer als die der übrigen Iso-late.

Tabelle 3.29: Anteil der ausgebildeten Körner an der Gesamtzahl der Körner pro Ähre (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation in Prozent (Ernte 63 dpi). Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34, 35, 36 und 37 mit der nicht inokulierten Kontrolle. Mittelwerte \pm Standardabweichung gefolgt vom gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($\alpha = 0,05$, LSD = 21,4).

	Kontrolle	34	35	36	37
n	17	10	13	13	9
Mittelwert $\pm \sigma_{n-1}$	99,0 \pm 2,2 a	64,6 \pm 24,3 bc	76,4 \pm 19,3 bc	84,3 \pm 15,9 ab	55,7 \pm 28,6 c

Bei einem Vergleich des Anteils ausgebildeter Körner an der Gesamtzahl Körner pro Ähre (Tab. 3.29) traten zwischen den Isolaten deutliche Unterschiede auf. Der Anteil an ausgebildeten Körnern war bei Isolat 36 am höchsten (84 %), gefolgt von den Isolaten 35, 34 und 37. Isolat 36 unterschied sich signifikant von Isolat 37. Die nicht inokulierte Kontrolle (99 %) unterschied sich signifikant von allen Isolaten außer von Isolat 36.

Der prozentuale Anteil unbefallener, leicht befallener und stark befallener Körner wurde für die einzelnen Isolate berechnet und mit der Kontrolle verglichen (Abb. 3.50). Als leicht befallen galt ein Korn, sobald es Dellen aufwies und es dadurch von der normalen Form eines gesunden Kornes abwich. Als stark befallen galt ein Korn, wenn es eine weißliche oder rötliche Färbung bzw. Myzelwachstum aufwies.

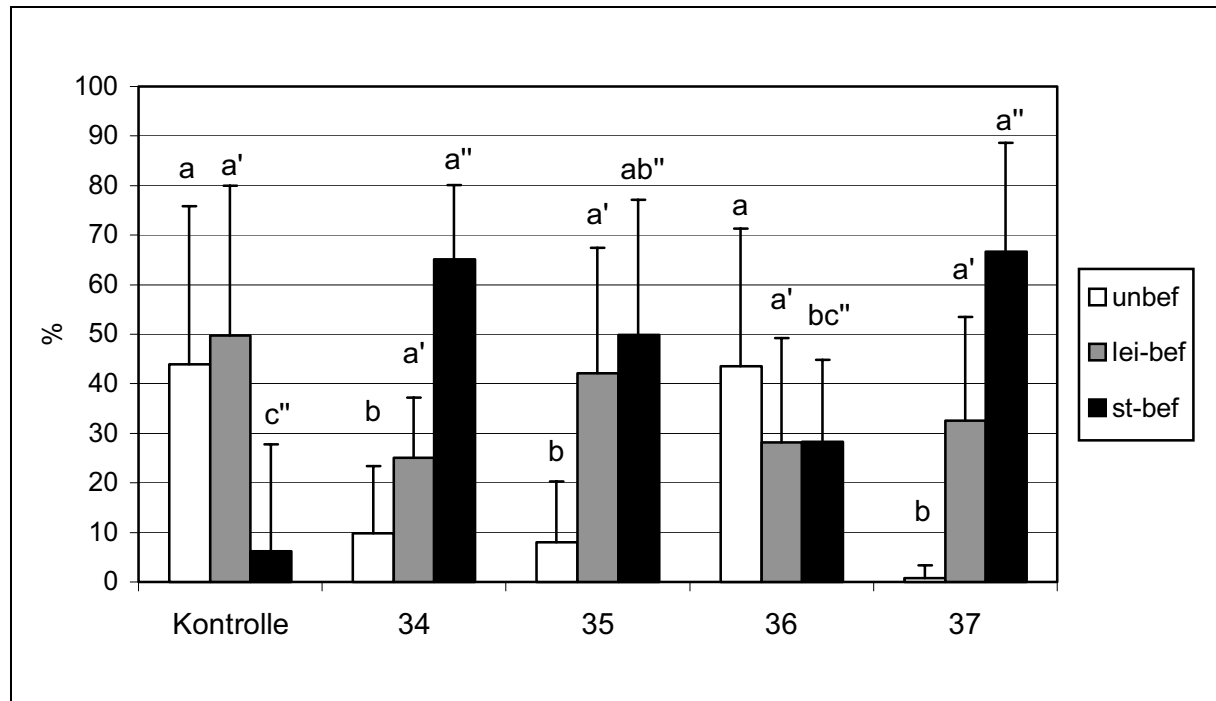


Abbildung 3.50: Prozentualer Anteil unbefallener (unbef), leicht befallener (lei-bef) und stark befallener (st-bef) Körner in Weizenähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34 (n = 10), 35 (n = 13), 36 (n = 13) und 37 (n = 9). Ernte 63 dpi. Mittelwerte + Standardabweichung. Es wurde nicht innerhalb der Säulengruppen statistisch verrechnet, sondern die gleichen Rubriken verschiedener Säulengruppen wurden miteinander verglichen. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($\alpha = 0,05$, $LSD = 26,2$, $LSD' = 27,7$, $LSD'' = 24,5$).

Es traten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen *F. graminearum*-Isolaten auf. Isolat 36 hatte die meisten gesunden Körner (44 %) und unterschied sich signifikant von allen anderen Isolaten. Isolat 37 wies mit nur etwa 1 % gesunden Körnern den geringsten Wert auf. Die Kontrolle lag mit 44 % gleich auf mit Isolat 37. Bei den leicht befallenen Körnern traten zwischen keiner der Varianten signifikante Unterschiede auf. Isolat 34 hatte mit 25 % die wenigsten, die Kontrolle mit 49 % die meisten leicht befallenen Körner. Bei den stark befallenen Körnern traten die deutlichsten Unterschiede auf. Isolat 37 zeigte hier mit 67 % knapp vor Isolat 34 (65 %) den höchsten Wert und unterschied sich von Isolat 36 und der nicht inokulierten Kontrolle signifikant. Isolat 36 zeigte signifikante Unterschiede zu Isolat 37 und 34. Die Kontrolle unterschied sich mit 6 % stark befallenen Körnern von allen Isolaten außer von Isolat 36. Der relativ leichte Befall der nicht inokulierten Kontrolle dürfte auf

Isolat 36. Der relativ leichte Befall der nicht inokulierten Kontrolle dürfte auf Sekundärinfektionen zurückzuführen sein (für diesen Versuch ab 35 dpi beobachtet).

In Abb. 3.51 ist dargestellt, wie sich die Trockenmasse der Ähren auf die einzelnen Fraktionen (Spindel, Spelzen, Körner) verteilte. Außerdem wurden die Körner wie oben beschrieben noch nach ihrem Befallsgrad aufgeteilt.

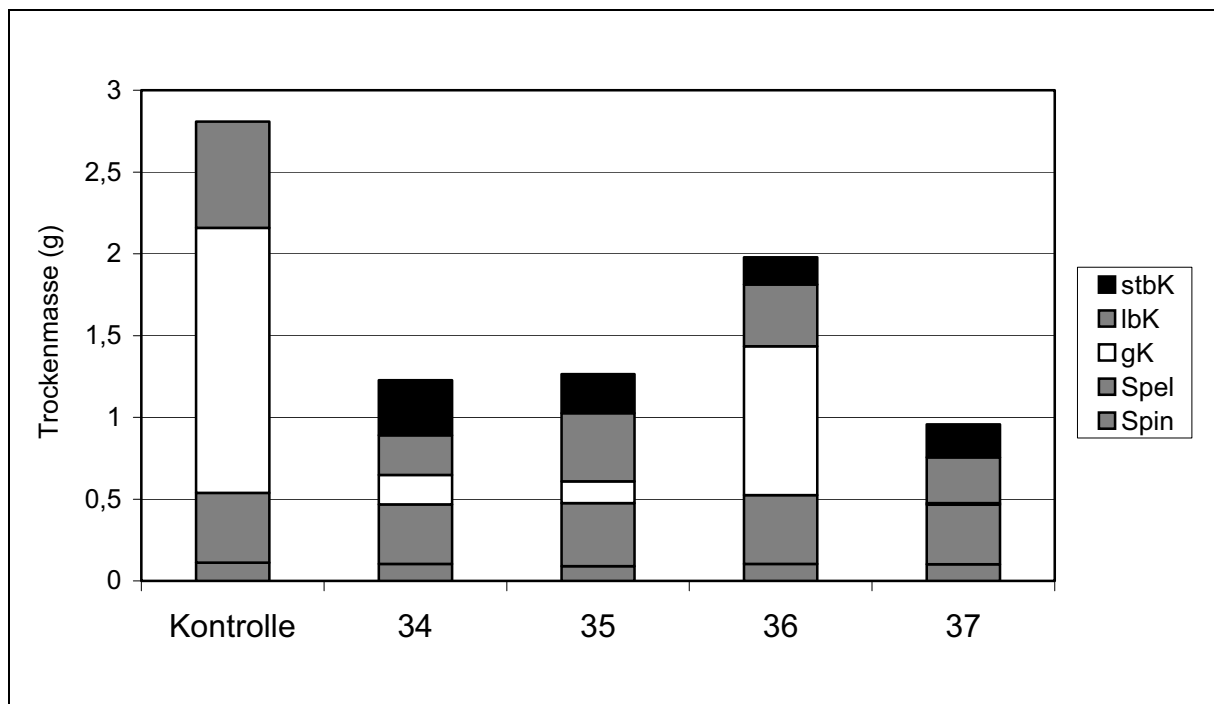


Abbildung 3.51: Absoluter Trockenmasse-Anteil (g) der verschiedenen Ähren-Fraktionen (Sommerweizen Picolo) Spindel (Spin), Spelzen (Spel), gesunde Körner (gK), leicht befallene Körner (lbK), stark befallene Körner (stbK) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34 (n = 10), 35 (n = 13), 36 (n = 13) und 37 (n = 9). Ernte 63 dpi. Auf eine Darstellung der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Signifikante Unterschiede siehe Tab. 3.30.

Auch hier traten zwischen den Isolaten Unterschiede sowohl in der Gesamttrockenmasse als auch in der Masse der einzelnen Fraktionen auf. Die Kontrolle und Isolat 36 bildeten insgesamt die größte Trockenmasse pro Ähre aus. Der Anteil der Spindel an der Gesamttrockenmasse mit etwa 0,1 g und der Spelzen mit etwa 0,4 g war für alle Isolate und die nicht inokulierte Kontrolle etwa gleich.

Tabelle 3.30: Signifikante Unterschiede zum Trockenmasse-Anteil der verschiedenen Ähren-Fraktionen (Sommerweizen Picolo) Spindel (Spin), Spelzen (Spel), gesunde Körner (gK), leicht befallene Körner (lbK), stark befallene Körner (stbK) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34 (n = 10), 35 (n = 13), 36 (n = 13) und 37 (n = 9). Ernte 63 dpi. Siehe Abb. 3.51. Kombinationen mit denselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$).

	Spin	Spel	gK	lbK	stbK
Kontrolle	a	a	a	a	b
34	a	a	b	b	a
35	a	a	b	ab	a
36	a	a	a	ab	ab
37	a	a	b	b	ab
LSD	0,026	0,103	0,665	0,360	0,189

Hier traten keine signifikanten Unterschiede auf (Tab. 3.30). Der Anteil gesunder Körner unterschied sich aber erheblich. Offensichtlich machte die Trockenmasse gesunder Körner den Großteil der Trockenmasse und den Hauptunterschied zu den übrigen Isolaten bei Isolat 36 und der Kontrolle aus. Dieser Unterschied war für die gesunden Körner signifikant. Isolat 37 besaß mit 9 mg fast gar keine gesunden Körner, die Isolate 34 und 35 eine relativ geringe auf gesunde Körner zurückgehende Trockenmasse. Der Anteil leicht befallener Körner an der Gesamttrockenmasse war für alle Varianten wieder relativ einheitlich. Die stark befallenen Körner machten bei allen Isolaten eine vergleichbare Trockenmasse aus (etwa 0,2 bis 0,3 g).

In Abb. 3.52 ist die Korngrößenverteilung für die mit den vier *F. graminearum*-Isolaten inokulierten Ähren dargestellt. Jedes Isolat und die Kontrolle bilden jeweils eine Säulengruppe.

Die Säulengruppen der Kontrolle und von Isolat 36 und andererseits die von Isolat 34 und 35 ähneln sich jeweils. Isolat 37 zeigte ein anderes Muster. So wiesen die Kontrolle und Isolat 36 von den großen Korngrößen zu den kleinen generell eine abnehmende Tendenz auf. Die meisten Körner (knapp 40 %) waren größer als 2,8 mm.

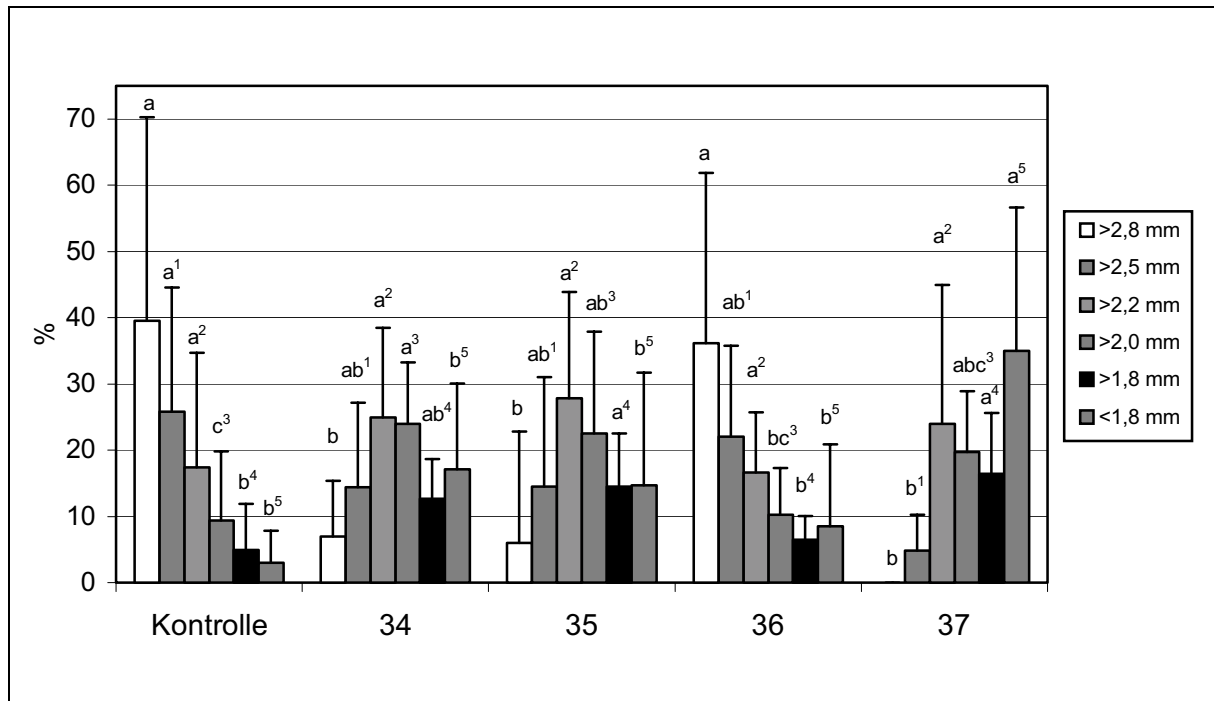


Abbildung 3.52: Korngrößenverteilung in Weizenähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation. Vergleich der vier *F. graminearum*-Isolate 34 (n = 10), 35 (n = 13), 36 (n = 13) und 37 (n = 9). Ernte 63 dpi. Mittelwerte + Standardabweichung. Es wurde nicht innerhalb der Säulengruppen statistisch verrechnet, sondern die gleichen Rubriken verschiedener Säulengruppen wurden miteinander verglichen (siehe Index der Signifikanz-Kürzel). Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($\alpha = 0,05$, $LSD = 25,2$, $LSD^1 = 17,5$, $LSD^2 = 18,2$, $LSD^3 = 12,5$, $LSD^4 = 8,0$, $LSD^5 = 16,1$).

Die Isolate 34 und 35 wiesen bei der Größenklasse "> 2,2 mm" ein Maximum (25 bis 30 %) auf, während für Isolat 37 die meisten Körner kleiner als 1,8 mm waren. Bei Isolat 37 traten keine Körner größer als 2,8 mm auf.

Zwischen den einzelnen Isolaten traten signifikante Unterschiede auf. Zusammengehörende Signifikanz-Kürzel (kleine Buchstaben) sind in Abb. 3.52 zur besseren Übersicht mit demselben Index versehen. Die größte Korngrößenklasse (> 2,8 mm) war in den nicht inokulierten Kontrollähren und Isolat 36 signifikant häufiger als in den übrigen *F. graminearum*-Isolaten. Für die Gruppe "> 2,5 mm" unterschied sich nur Isolat 37 signifikant von der Kontrolle. In der Klasse "> 2,2 mm" traten gar keine signifikanten Unterschiede auf. Die Kontrolle wies signifikant weniger Körner größer als 2,0 mm auf als Isolat 34 und 35, Isolat 36 nur signifikant weniger als Isolat 34. In der zweitkleinsten Korngrößenklasse (> 1,8 mm) waren für Iso-

lat 37 und 35 signifikant mehr Körner vertreten als für Isolat 36 oder die Kontrolle. Für die kleinste Größe ($< 1,8$ mm) hatte Isolat 37 signifikant mehr Körner als alle anderen aufzuweisen.

Zusammenfassend für Tab. 3.28 bis Tab. 3.30 und Abb. 3.50 bis 3.52 lässt sich sagen, dass hinsichtlich der untersuchten Ernte-Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten auftraten. Isolat 36 wies stets die geringste Schädigung bzw. den höchsten Ertrag auf und zeigte die höchste Ähnlichkeit zur Kontrolle. Die Isolate 34, 35 und 37 unterschieden sich relativ selten signifikant voneinander. Meist wies dann Isolat 37 die stärkste Schädigung bzw. den geringsten Ertrag auf.

3.7.7.2 Korrelationen von Ertrag und Befall auf Ebene der 45 Einzelähren

In Tabelle 3.31 wurden einige Parameter der geernteten Ähren miteinander korreliert.

Die zehn dargestellten Parameter können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Zum einen sind die Ertragsparameter zu nennen. Hierunter fallen Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM), Kornzahl pro Ähre (KÄ), Tausendkornmasse (TKM) und die Anteile an den Korngrößenklassen " $> 2,8$ mm" ($>2,8$) und " $< 1,8$ mm" ($<1,8$). Außerdem gibt es noch die Befallsparameter. Dazu gehören der Anteil gesunder Körner (gK), der Anteil stark befallener Körner (stbK), die Befallshäufigkeit (BH) und die Fläche unter der Befallskurve (FUBK).

Die Parameter innerhalb jeder dieser Gruppen stehen wie schon erwähnt in Beziehung zueinander, weil sie entweder rechnerisch miteinander verknüpft sind, oder aber dieselbe Datengrundlage besitzen. Korrelationen, die innerhalb dieser Gruppen auftraten, sollten daher nicht überbewertet werden und werden in den folgenden Besprechungen nur teilweise berücksichtigt.

Zwischen fast allen Parametern bestanden höchst signifikante Korrelationen. Die Frischmasse korrelierte zu allen Parametern höchst signifikant, die Trockenmasse ebenfalls (Ausnahme: Kornzahl pro Ähre: hoch signifikant). Die Kornzahl pro Ähre zeigte keine weiteren signifikanten Beziehungen, und zwar als einziger Parameter. Offensichtlich besteht eine relativ hohe Unabhängigkeit von den anderen Größen. Die Tausendkornmasse korrelierte wiederum mit allen Größen höchst signifikant. Diese Größe wurde offensichtlich von vielen anderen Faktoren beeinflusst. Hier bestand eine vergleichsweise starke Abhängigkeit zu den Befallsparametern (zu gK: $R = 0,87$). Dies galt auch für die Korngrößenklasse $>2,8$, nicht aber in diesem

3.7.7.3 Ergebnisse zum DON-Gehalt

Aus den geernteten Ähren, deren Einzelergebnisse zu Befall und Ertrag unter 3.7.7.1 beschrieben werden, wurden nun pro Isolat 3 Mischproben hergestellt und diese auf ihren DON-Gehalt untersucht. In Abb. 3.53 ist die DON-Verteilung zur Ernte auf die drei Ährenbereiche Spindel, Spelzen, Körner dargestellt. In diesem Fall wurden wegen zu geringer Menge an Probenmaterial keine Einzelähren verarbeitet, sondern Mischproben aus drei bis fünf Einzelähren hergestellt. In dieser Abbildung erfolgte die statistische Verrechnung nur innerhalb der Säulengruppen.

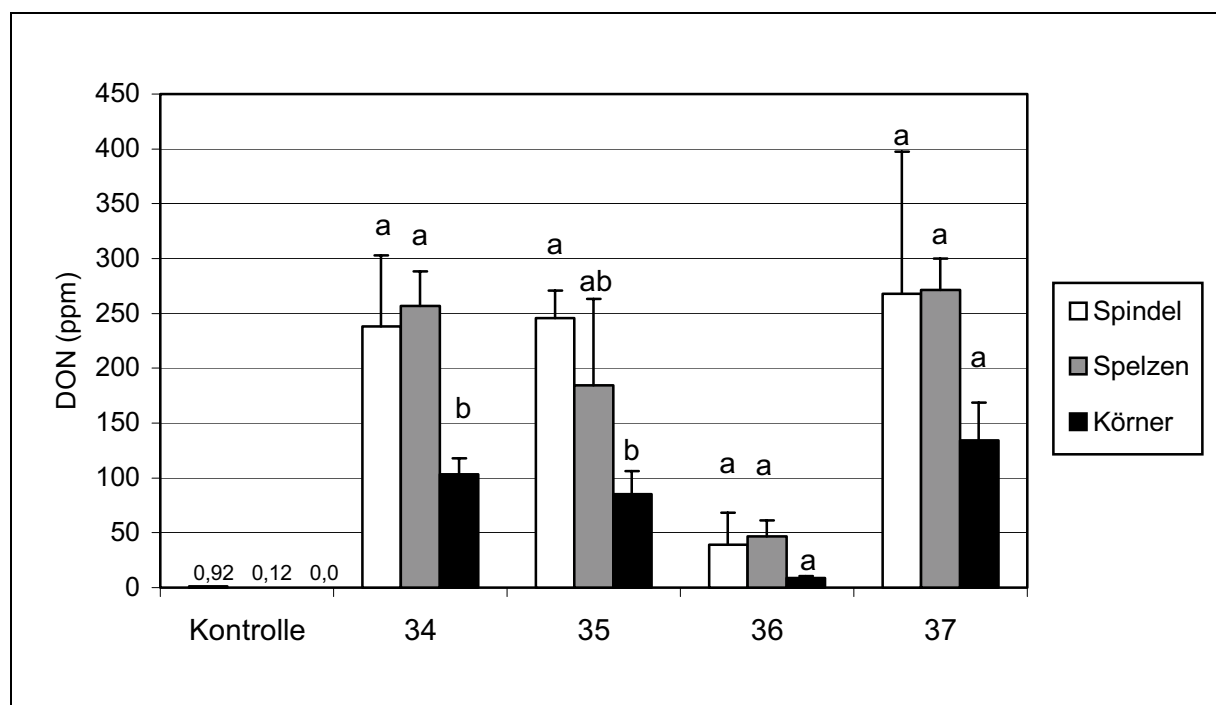


Abbildung 3.53: DON-Gehalt der einzelnen Ährenbereiche Spindel, Spelzen und Körner (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 (Ernte 63 dpi). Die Mittelwerte basieren auf je drei Mischproben ($n = 3$), Isolat 34/Spelzen: $n = 2$), die wiederum aus 3 bis 5 Einzelähren bestanden. Die Kontroll-Ähren wurden nicht inokuliert ($n = 1$). Statistischer Vergleich der Ährenbereiche innerhalb der einzelnen Isolate. Säulen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha = 0,05$, $LSD_{34} = 127,1$, $LSD_{35} = 123,1$, $LSD_{36} = 47,3$, $LSD_{37} = 198,1$).

Zwischen den einzelnen Bereichen der Ähren traten signifikante Unterschiede im DON-Gehalt auf. Die Körner enthielten stets weniger DON als die Spindel oder Spelzen. Für die

Isolate 34 und 35 war dieser Unterschied teilweise signifikant. Die Spindeln und Spelzen ähnelten sich im DON-Gehalt. Ein signifikanter Unterschied trat hier bei keinem der Isolate auf. Der minimale DON-Gehalt in der Kontroll-Mischprobe dürfte wiederum auf späte Sekundär-Infektionen zurückzuführen sein.

Isolat 36 bildete in den Bereichen Spindel (LSD = 195,8), Spelzen (LSD = 134,5) und Körner (LSD = 56,3) signifikant weniger DON als die übrigen Isolate, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Tabelle 3.32: Prozentuale Verteilung der DON-Menge pro Ähre auf die einzelnen Ährenbereiche Spindel, Spelzen und Körner (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 (Ernte 63 dpi). Die Mittelwerte basieren auf je drei Mischproben ($n = 3$, Isolat 34/Spelzen: $n = 2$), die wiederum aus 3 bis 5 Einzelähren bestanden. Ein statistischer Vergleich zwischen den einzelnen Isolaten ergab keine signifikanten Unterschiede ($\alpha = 0,05$, $\text{LSD}_{\text{Spindel}} = 16,5$, $\text{LSD}_{\text{Spelzen}} = 24,7$, $\text{LSD}_{\text{Körner}} = 14,1$).

	Spindeln	Spelzen	Körner
34	14,5 ± 1,2	49,5 ± 4,2	36,0 ± 3,0
35	14,9 ± 6,3	43,0 ± 11,4	42,1 ± 5,6
36	10,6 ± 7,3	53,9 ± 9,1	35,5 ± 6,4
37	13,7 ± 4,7	52,1 ± 6,1	34,2 ± 2,7

Die prozentuale Verteilung von DON auf die einzelnen Ährenbereiche (Tab. 3.32) ist allerdings zwischen den einzelnen Isolaten wiederum vergleichbar, vermutlich aufgrund des verschieden großen Anteils der Trockenmasse der Körner an der Gesamttrockenmasse (Abb. 3.51). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten. In den Spindeln waren 11 bis 15 % des DON enthalten, in den Spelzen 43 bis 54 % und in den Körnern 34 bis 42 %. Dieser relativ hohe Anteil in den Körnern trotz des vergleichsweise geringen DON-Gehalts (Abb. 3.53) in diesem Ähren-Bereich dürfte auf den generell hohen Anteil der Körner an der Gesamttrockenmasse zurückzuführen sein.

3.7.7.4 Korrelationen zwischen DON-Gehalt, Befall und Ertrag auf Ebene

der 12 Mischproben

In Tabelle 3.33a wurden einige Parameter mit dem DON-Gehalt (DON 1) der verschiedenen Ähren-Bereiche korreliert. Dazu gehörten die Befallsparameter BH, FUBK, der Anteil gesunder, stark befallener und ausgebildeter Körner. Ebenso wurden die Ertragsparameter Kornzahl pro Ähre, Tausendkornmasse, Kornmasse pro Ähre und Anteil der Körner $> 2,8\text{mm}$ bzw. $< 1,8\text{ mm}$ untersucht. Da es sich um Mischproben aus jeweils drei bis fünf Einzelähren handelte, wurden die Werte für die Mischproben nicht als einfacher Mittelwert berechnet, sondern es erfolgte eine Gewichtung der Einzelähren nach dem Trockenmasse-Anteil, den sie jeweils zur Gesamt-Trockenmasse der Mischprobe beitrugen. Die Werte jeder Einzelähre gingen also entsprechend ihrem Gewicht in den gemeinsamen Wert der Mischprobe ein.

Der einzige Parameter ohne höchst signifikante Beziehungen zum DON-Gehalt ist die Kornzahl pro Ähre. Die Kategorie $<1,8$ wies die am wenigsten enge, aber dennoch in zwei Fällen hoch signifikante Korrelation zum DON-Gehalt auf. Der DON-Gehalt der Gesamtähren zeigte für alle Fälle die deutlichste und fast immer höchst signifikante Korrelation. Der DON-Gehalt in den Körnern lieferte bis auf zwei Fälle die zweitbeste Korrelation zu den 9 Parametern. Nur für zwei Parameter (BH und $<1,8$) war die Beziehung zum DON-Gehalt der Spelzen enger. Der Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt der Spindel und den neun Parametern war in allen neun Fällen der schwächste.

Die engste signifikante Korrelation zwischen DON-Gehalt und den Befallsparametern bestand für alle Ährenbereiche zu dem Anteil stark befallener Körner (max. 0,97). Die Beziehung zur Befallshäufigkeit war insgesamt vergleichsweise schwach (max. 0,91).

Tabelle 3.33: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge verschiedener Parameter nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit den Isolaten 34, 35, 36 oder 37 (Ernte 63 dpi). Die Mittelwerte basieren auf je zwölf (elf) Mischproben ($n = 12$ bzw. $n = 11$ (DON 1 gesamt und DON 1 Spelzen), die wiederum aus 3 bis 5 Einzelähren bestanden. Da es sich um Mischproben handelte, wurden die Werte für Parameter 1-10 nach dem jeweiligen TM-Anteil der 3-5 Einzelähren an der Gesamt-TM der Mischprobe korrigiert. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM). % K = Anteil ausgebildeter Körner an der Gesamtzahl der Körner, KmÄ = Kornmasse pro Ähre.

In **Tabelle a)** sind die Zusammenhänge zwischen dem **DON-Gehalt** (DON 1, gesamt und für Spindel, Spelzen und Körner) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und zehn weiteren Parametern dargestellt.

	BH	FUBK	gK	stbK	% K	KÄ	TKM	KmÄ	>2,8	<1,8
DON 1 gesamt	0,91***	0,95***	-0,93***	0,97***	-0,93***	-0,06	-0,96***	-0,95***	-0,89***	0,81**
DON 1 Spindel	0,71**	0,80**	-0,85***	0,89***	-0,75**	-0,15	-0,81**	-0,82**	-0,78**	0,55
DON 1 Spelzen	0,90***	0,90***	-0,90***	0,91***	-0,84**	-0,05	-0,93***	-0,93***	-0,85***	0,77**
DON 1 Körner	0,87***	0,93***	-0,93***	0,95***	-0,85***	-0,05	-0,94***	-0,93***	-0,88***	0,73**

In **Tabelle b)** sind die Zusammenhänge zwischen **Ertrags- und Befallsparametern** dargestellt ($n = 11$).

	% K	TKM	KmÄ	>2,8	<1,8
BH	-0,93***	-0,93***	-0,95***	-0,85***	0,91***
FUBK	-0,94***	-0,93***	-0,93***	-0,83**	0,93***
gK	0,79**	0,96***	0,97***	0,93***	-0,72*
stbK	-0,94***	-0,90***	-0,90***	-0,81**	0,75**

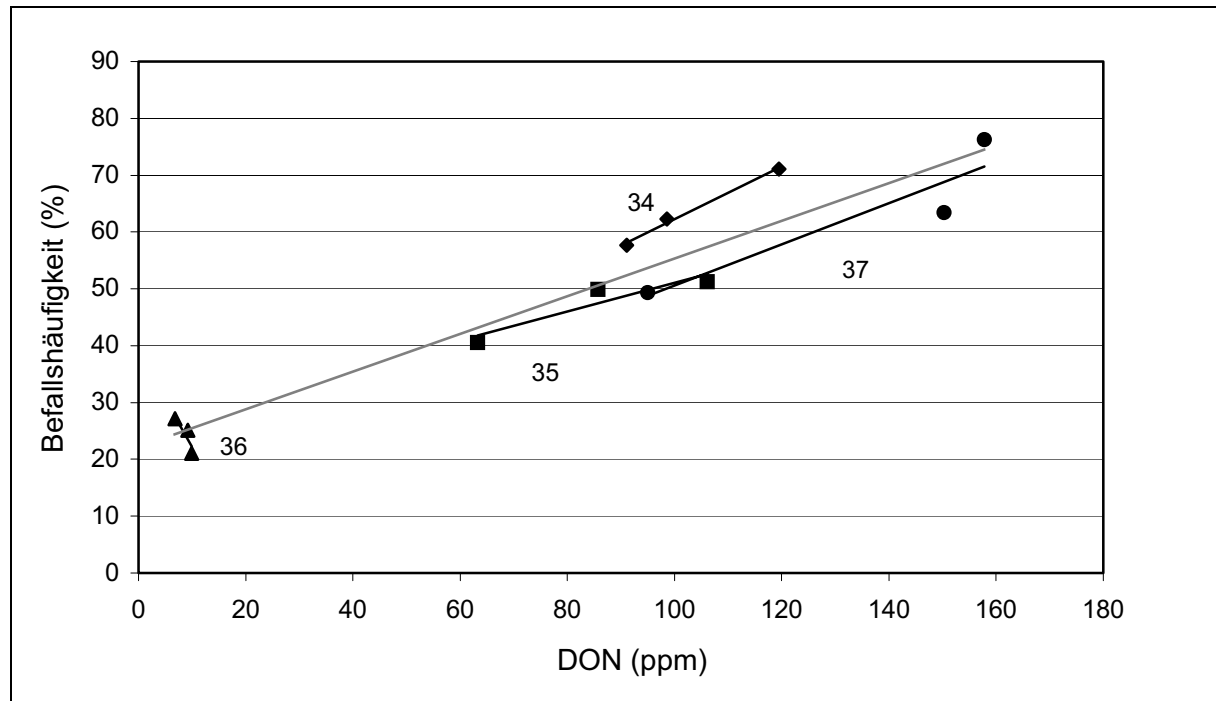


Abbildung 3.54: Korrelation zwischen dem DON-Gehalt (ppm \triangleq mg/kg TM (DON 1)) der Körner (Sommerweizen Picolo) und dem Anteil stark befallener Körner nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 34, 35, 36 oder 37 (Ernte 63 dpi). Pro Isolat 3 Mischproben ($n = 3$), die wiederum aus 3 bis 5 Einzelähren bestanden. \blacklozenge = Isolat 34; \blacksquare = Isolat 35; \blacktriangle = Isolat 36; \bullet = Isolat 37. Datenpunkte der einzelnen Isolate beschriftet. Lineare Regression. Helle Linie = gemeinsame lineare Regression für alle Isolate.

Auch der DON-Gehalt der Körner korrelierte am stärksten mit dem Anteil an Körnern, die starke Befallssymptome zeigten (siehe Abb. 3.54). Als Parameter mit der zweitbesten Korrelation konnte hier die Fläche unter der Befallskurve angesehen werden ($R = 0,93$). Die Lage der Datenpunkte der Isolate 34, 35 und 37 in Abb. 3.54 unterschied sich wenig voneinander. Auch die Regressionen wiesen einen vergleichbaren Verlauf auf. Die Datenpunkte von Isolat 36 lagen in einem anderen Bereich des Diagramms. Die lineare Regression war nicht mit der der anderen Isolate zu vergleichen und zeigte überdies eine negative Steigung. Obwohl die gemeinsame Regression für die Werte aller Isolate relativ eng war ($R = 0,95$), ist ein nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen DON-Gehalt der Körner und dem Anteil stark befallener Körner bei dem vergleichsweise schwachen DON-Bildner Isolat 36 nicht gegeben.

In ertraglicher Hinsicht stand der DON-Gehalt am stärksten mit der Tausendkornmasse und der Kornmasse pro Ähre in Beziehung.

In Tab. 3.33b sind diese Zusammenhänge zwischen Befall mit *F. graminearum* und Ertrag dargestellt. Obwohl die meisten Beziehungen höchst signifikant sind, sind die Korrelationen einiger Parameter deutlich enger als die anderer. Ein Befall schien sich so am ehesten über die Kornmasse pro Ähre (Parameter BH und gK) und den Anteil ausgebildeter Körner auf den Betrag auszuwirken (Parameter FUBK und stbK). Auch die Tausendkornmasse stand in relativ enger Beziehung zu allen Befallsparametern. Ein Ertragsverlust durch die Korngröße (Parameter >2,8 und <1,8) wurde durch die verwendeten Befallsparameter hingegen deutlich schlechter erfasst oder aber von *F. graminearum* nicht so stark beeinflusst. Neben den schon in Tab. 3.31 erwähnten Größen TKM und >2,8 wirkte sich ein *F. graminearum*-Befall offensichtlich auch durch Abnahme der Kornmasse pro Ähre aus.

Über einen möglichen Ertragsverlust gab der Parameter Anteil gesunder Körner die zuverlässigste Auskunft (engste Korrelation zu den Parametern TKM, KmÄ und >2,8). Insgesamt liegen die Korrelationen für die verschiedenen Befallsparameter aber alle eng beieinander.

3.7.7.5 Korrelationen zwischen DON-Gehalt, Befall und Ertrag auf Isolat-Ebene

Die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt zur Ernte in den Gesamtähren oder den Körnern und den Befalls- und Ertragsparametern zur Ernte werden in Tab. 3.34 auf Isolat-Ebene dargestellt. Dem liegt die Frage zugrunde, welche Eigenschaften starke DON-Bildner zum Ernte-Zeitpunkt sonst noch auszeichnen.

Außer zu den Parametern Anteil ausgebildeter Körner und Anteil der Körner kleiner 1,8 mm korrelierten beide DON-Größen mit allen anderen Parametern signifikant bis höchst signifikant. Bei den Befalls-Parametern bestand der engste Zusammenhang zum Anteil stark befallener Körner (DON 1 gesamt) bzw. zum Anteil gesunder Körner und der Fläche unter der Befallskurve. Die Isolate, die bezogen auf die Gesamtähre nach 63 Tagen mehr DON gebildet hatten, wiesen also auch einen höheren Anteil stark befallener Körner auf. Andererseits galt, je höher die Fläche unter der Befallskurve oder je geringer der Anteil gesunder Körner war, umso höher war der DON-Gehalt der Körner. Aber auch zu den anderen Parametern bestand eine relativ enge Korrelation.

Tabelle 3.34: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt der Gesamtähren oder der Körner und anderen Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit den Isolaten 34, 35, 36 oder 37 (Ernte 63 dpi) auf Isolat-Ebene. Die Mittelwerte für jedes der vier Isolate ($n = 4$) basieren auf je drei Mischproben, die wiederum aus 3 bis 5 Einzelähren bestanden. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM). % K = Anteil ausgebildeter Körner an der Gesamtzahl der Körner, KmÄ = Kornmasse pro Ähre.

	BH	FUBK	gK	stbK	% K	TKM	KmÄ	>2,8	<1,8
DON 1 gesamt	0,97*	0,97*	-0,97*	0,99**	-0,93	-0,99*	-0,99**	-0,98*	0,80
DON 1 Körner	0,96*	0,98*	-0,98*	0,96*	-0,93	-0,9998***	-0,9998***	-0,99*	0,85

Bei den Ertragsparametern bestand zwischen den Größen zum DON-Gehalt und der Tausendkornmasse oder der Kornmasse pro Ähre die engste Beziehung. Wenn die Gesamtähre oder die Körner zur Ernte stark mit DON belastet waren, dann wiesen sie auch eine stark verringerte Tausendkornmasse und Kornmasse pro Ähre auf.

3.7.7.6 Zusammenfassung zu den Ernte-Ergebnissen der 3. Ähren-Inokulation

Zusammenfassend kann man zu den Ergebnissen zur Ernte (63 dpi) sagen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen DON-Gehalt, Befalls- und Ertragsparametern bestand. Dies galt sowohl auf der Ebene der einzelnen Ähren oder Mischproben (Tab. 3.31 und 3.33) als auch auf Isolat-Ebene (Abb. 3.54, Tab. 3.34). Isolat 36, das insgesamt relativ niedrige Befalls- und DON-Werte aufwies, zeigte Abweichungen von dieser allgemeinen Aussage (Abb. 3.54). Besonders enge Korrelationen bestanden je nach untersuchtem Ährenbereich zwischen dem DON-Gehalt und dem Anteil stark befallener Körner und der Fläche unter der Befallskurve. Ein Befall mit *F. graminearum* schien sich am deutlichsten über die Kornmasse pro Ähre, aber auch über die Tausendkornmasse und den Anteil großer Körner auszuwirken (Tab. 3.31, Tab. 3.33b).

Die Körner wiesen teils signifikant weniger DON auf als die Bereiche Spindel und Spelzen (Abb. 3.53). Außerdem war die Korngrößenverteilung bei Befall mit *F. graminearum* zu kleineren Körnern verschoben (Abb. 3.52). Der hauptsächliche Unterschied im Trockenmasse-

Anteil der verschiedenen Ährenbereiche an der Gesamtähre bestand zwischen aggressiveren und weniger aggressiven Isolaten darin, dass bei den weniger aggressiven die gesunden Körner einen großen Teil der Trockenmasse einnahmen. Der Anteil von Spindeln und Spelzen war nahezu konstant (Abb. 3.51, Tab. 3.30). Isolat 36 ähnelte bei all diesen Parametern am stärksten der Kontrolle. Dies galt auch für den Anteil ausgebildeter Körner (Tab. 3.28), die Kornmasse pro Ähre und die Tausendkornmasse (Tab. 3.29) oder die prozentualen Anteile von gesunden, schwach oder stark befallenen Körnern (Abb. 3.50).

3.7.8 Vierte Ähren-Inokulation

Diese Ähren-Inokulation unterschied sich von den drei vorherigen darin, dass nur ein *F. graminearum*-Isolat, aber verschiedene Weizen-Sorten getestet wurden. Als Pathogen wurde das *F. graminearum*-Isolat Nr. 35 verwendet. Als Sommerweizensorten wurden die Sorten Picolo (wie in den vorherigen Versuchen) mit mittlerer Anfälligkeit gegen Ährenfusariosen ausgewählt und die begannte südamerikanische Sorte Frontana, die als resistent gilt (MILLER UND ARNISON 1986).

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Sorten ist die verschiedene Halmlänge, die für die Infektionswahrscheinlichkeit eine Rolle spielen kann. Die Halme der inokulierten Frontana-Pflanzen (n = 44) waren mit durchschnittlich 72,7 cm höchst signifikant länger als die der Sorte Picolo (n = 35) mit 51,3 cm.

3.7.8.1 Entwicklung des Befalls und des DON-Gehalts

In diesem Versuch wurde nur die Befallshäufigkeit der Ährchen erhoben und nur während der ersten 14 Tage mehrmals wöchentlich bonitiert. An drei Terminen (7 dpi, 21 dpi, 63 dpi) wurden pro Isolat jeweils vier Mischproben (aus zwei oder drei (63 dpi) Einzelähren) für die DON-Analysen entnommen. Die nicht inokulierten Kontrollähren zeigten, dass ab 14 dpi (Picolo) oder 28 dpi (Frontana) Sekundärinfektionen auftraten. Bei Frontana setzten die Sekundärinfektionen erst später ein, waren aber sehr viel intensiver als bei Picolo. In Abb. 3.55 ist der Befallsverlauf dargestellt.

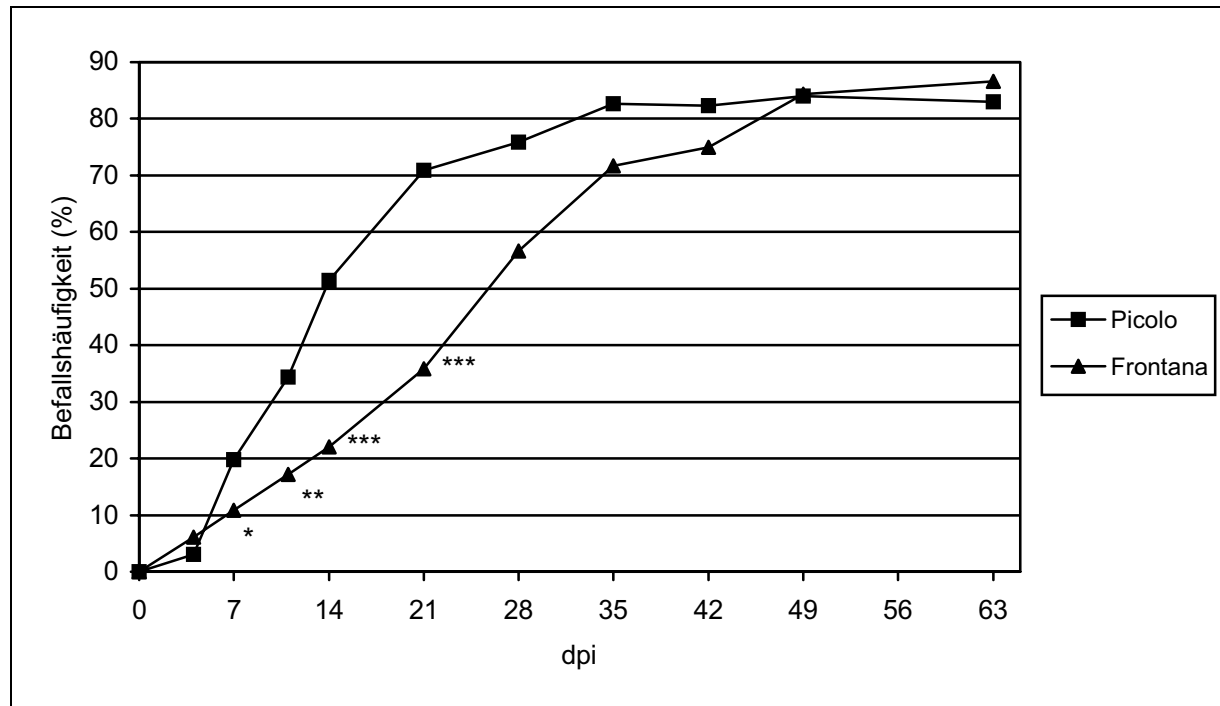


Abbildung 3.54: Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit dem *F. graminearum*-Isolat 35 von 0 dpi bis 63 dpi in Prozent. Vergleich der beiden Sommerweizensorten Picolo und Frontana. Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von 0 dpi bis 63 dpi bedingt durch die Probennahme von $n = 38$ (Picolo) bzw. $n = 44$ (Frontana) auf $n = 13$ (Picolo) oder $n = 18$ (Frontana) ab. Regression: Polynom 3. Grades (Picolo) bzw. 4. Grades (Frontana). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Der Verlauf der Befallshäufigkeit der Ährchen zeigte auch in diesem Versuch das schon vormals beschriebene sigmoide Bild (Abb. 3.34, 3.38, 3.44). Einer kurzen Anlaufphase zu Beginn folgte eine nahezu lineare Phase, die bei der Sorte Picolo ab 35 dpi, bei Frontana erst ab 49 dpi einen Höchstwert anstrebte. Die Kurve für Frontana verlief mit insgesamt schwächerer Steigung, der Befall von Picolo stieg zu Beginn deutlich schneller an. Für beide Sorten wurde ein vergleichbarer Endwert erreicht (Picolo: 83 %, Frontana: 87 %), obwohl die Sorte 7 dpi bis 42 dpi geringer befallen war als Picolo. Für 7 dpi war dieser Unterschied signifikant, für 11 dpi hoch signifikant und für 14 und 21 dpi sogar höchst signifikant.

Auch im Verlauf des DON-Gehalts bestanden zwischen den beiden Sorten deutliche Unterschiede (Abb. 3.56). Neben dem Parameter DON 1 (gefüllte Symbole) wird der Parameter

DON 2 (offene Symbole) dargestellt, der den DON-Gehalt nur auf die befallene Trockenmasse der Ähren bezieht.

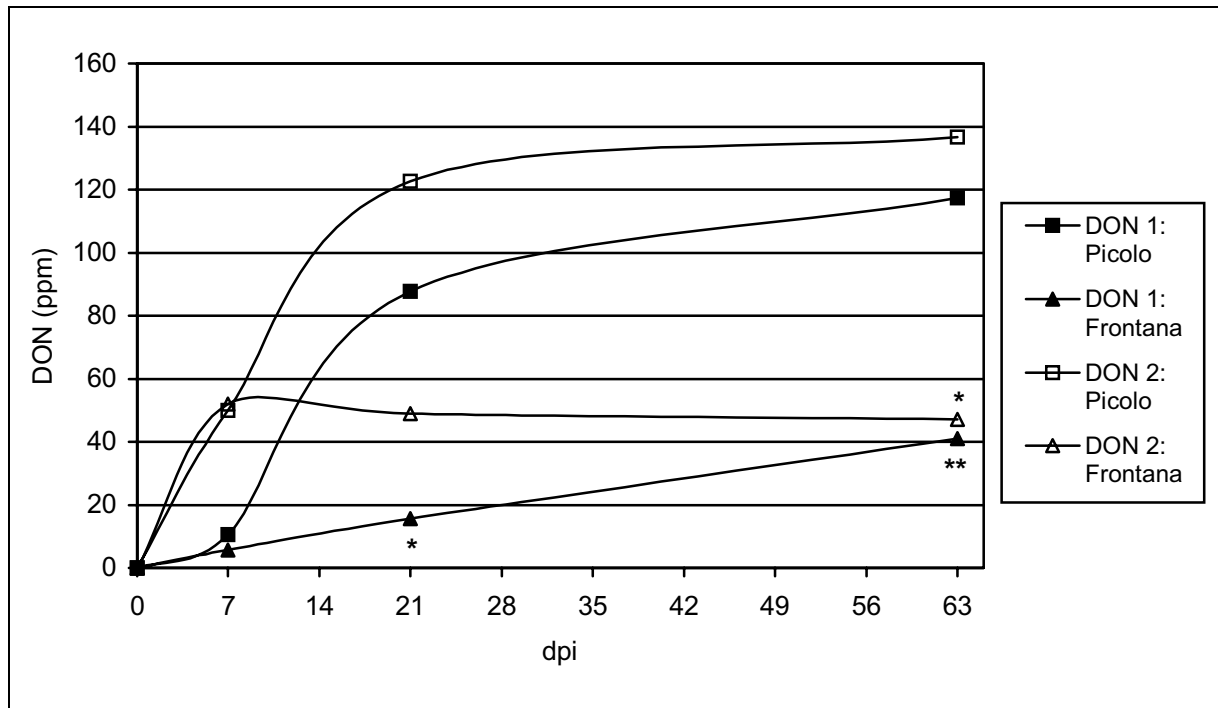


Abbildung 3.56: Entwicklung des DON-Gehalts (DON 1 und DON 2) ganzer Ähren nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit dem *F. graminearum*-Isolat 35 von 0 dpi bis 63 dpi in ppm. Vergleich der beiden Sommerweizensorten Picolo und Frontana. Mittelwerte aus jeweils 4 Einzelwerten ($n = 4$). Die Einzelwerte basieren auf Mischproben aus zwei (7 dpi, 21 dpi) oder drei (63 dpi) Einzelähren. Gefüllte Symbole: DON 1, offene Symbole: DON 2. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$).

Der DON-Gehalt (DON 1) bei Picolo zeigte auch wieder einen sigmoiden Verlauf, der für Frontana aufgrund des niedrigen Niveaus und einer zeitlichen Verzögerung nicht zu erkennen war, sondern hier einer linearen Kinetik wich. Bei Picolo stieg der DON-Gehalt bis 21 dpi stark an (88 ppm), um dann mit geringerer Steigung den Endwert von 117 ppm (63 dpi) zu erreichen. Für Frontana war der DON-Gehalt stets niedriger als bei Picolo, besonders ab 21 dpi, und stieg von einem Startwert von 6 ppm (7 dpi) auf den Endwert von 41 ppm. Dieser Unterschied im DON-Gehalt zwischen den beiden Sorten war für 21 dpi und 63 dpi signifikant bzw. hoch signifikant. Der Parameter DON 2 war mit DON 1 vergleichbar, was durch

die enge mathematische Verknüpfung der beiden Faktoren bedingt war (Formel 2.10). Da die Befallshäufigkeit der Ährchen noch als Divisor (kleiner als 1) in die Berechnung miteingeht, lag der Wert für DON 2 definitionsgemäß höher als der für DON 1, weil der DON-Gehalt eben nur auf die befallene Ährenmasse bezogen wurde. Da der DON-Gehalt bei Frontana von 7 dpi bis 63 dpi einen relativ geringeren Anstieg zeigte, die zugehörige Befallshäufigkeit aber relativ stark zunahm, blieb der Parameter DON 2 ab 7 dpi auf demselben Level bzw. nahm bis 63 dpi sogar wieder leicht ab. Der Unterschied zwischen Picolo und Frontana war für DON 2 nur bei 63 dpi signifikant.

Zusammenfassend ist an dieser Stelle zu sagen, dass die Sorte mit der schnelleren und über weite Strecken stärkeren Symptomausprägung (Picolo) auch den höheren DON-Gehalt aufwies. Auffällig ist, dass die Befallshäufigkeit beider Sorten zur Ernte ausgeglichen war, aber der DON-Level in der Sorte Frontana auf einem niedrigeren Niveau verblieb.

Die Unterschiede zwischen den beiden Sorten bezüglich des Befallsverlaufs und des DON-Gehalts entsprachen von ihrer Charakteristik dem Unterschied zwischen *F. graminearum*-Isolaten verschiedener Aggressivität und DON-Bildung.

3.7.8.2 Korrelationen zwischen DON-Gehalt und Befallsparametern auf Ebene der Einzelähren

In Tab. 3.35 und 3.36 werden wie auch schon in den Versuchen 1, 2 und 3 die drei DON-Parameter mit 5 weiteren Parametern korreliert, und zwar getrennt nach Weizensorten. Dadurch soll geklärt werden, ob hinsichtlich dieser Korrelationen zwischen den beiden verwendeten Sorten Unterschiede bestanden.

Für die Sorte Picolo bot sich in Bezug auf die Korrelationen im allgemeinen das schon aus den vorigen Versuchen bekannte Bild (Tab. 3.15). Es bestanden signifikante Korrelationen zwischen DON 1 und der Frischmasse, dem Wassergehalt und vor allem den beiden Befallsparametern BH und FUBK. Vergleichbare Beziehungen bestanden für DON 3, während DON 2 weniger enge Korrelationen aufwies. Insgesamt bestanden mehr Korrelationen zur Frischmasse als zur Trockenmasse einer Ähre.

Für die Sorte Frontana sahen die Verhältnisse anders aus (Tab. 3.36).

Tabelle 3.35: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 35 (7 dpi, 21 dpi und 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 12 Mischproben in die Berechnung ein ($n = 12$). Jede Mischprobe setzt sich aus zwei oder drei (63 dpi) Einzelähren zusammen. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge ($\mu\text{g}/\text{Ähre}$).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,92***	0,81**	-0,68*	0,10	-0,81**	0,79**	0,71*
2	DON 2		0,66*	-0,72**	-0,12	-0,60*	0,58*	0,50
3	DON 3			-0,28	0,62*	-0,83***	0,88***	0,64*
4	Frischmasse (FM)				0,50	0,54	-0,36	-0,66*
5	Trockenmasse (TM)					-0,41	0,53	0,16
6	Wassergehalt (WG)						-0,91***	-0,91***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,77**
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Die Korrelationen zwischen DON 1 bzw. DON 3 und den Befallsparametern und dem Wassergehalt waren sehr eng und alle höchst signifikant (Tab. 3.36). DON 2 zeigte zu keinem der Parameter eine signifikante Beziehung, nicht einmal zu DON 1 oder DON 3. Vermutlich lag der Grund dafür in der überproportionalen Zunahme der Befallshäufigkeit verglichen mit dem DON-Gehalt gegen Ende der Vegetation. Es bestanden relativ viele signifikante Korrelationen zur Trockenmasse, nicht aber zur Frischmasse.

Auch in dieser Hinsicht war die Sorte Frontana vergleichbar einem *F. graminearum*-Isolat vergleichsweise schwacher Aggressivität und DON-Bildung (Tab. 3.16). Auch für Isolat 36 war das Fehlen einer Beziehung zwischen DON 1 und DON 2 und eine höhere Anzahl Korrelationen zur Trockenmasse als zur Frischmasse charakteristisch.

Tabelle 3.36: Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Frontana) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 35 (7 dpi, 21 dpi und 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 12 Mischproben in die Berechnung ein ($n = 12$). Jede Mischprobe setzt sich aus zwei oder drei (63 dpi) Einzelähren zusammen. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge ($\mu\text{g}/\text{Ähre}$).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,24	0,94***	-0,28	0,61*	-0,90***	0,90***	0,95***
2	DON 2		0,07	-0,16	-0,19	0,08	-0,07	0,01
3	DON 3			-0,17	0,79**	-0,96***	0,96***	0,92***
4	Frischmasse (FM)				0,38	0,25	-0,20	-0,40
5	Trockenmasse (TM)					-0,77**	0,79**	0,57
6	Wassergehalt (WG)						-0,99***	-0,94***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,93***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Auf eine Korrelation der Parameter auf Sorten-Ebene (analog der Korrelation auf Isolat-Ebene in Tab. 3.18 und 3.25) wird wegen der zu geringen Anzahl untersuchter Sorten verzichtet.

In Abb. 3.57 ist die Korrelation zwischen den Parametern DON 1 und der Befallshäufigkeit graphisch dargestellt. Die Datenpunkte beider Sorten sind verschieden markiert.

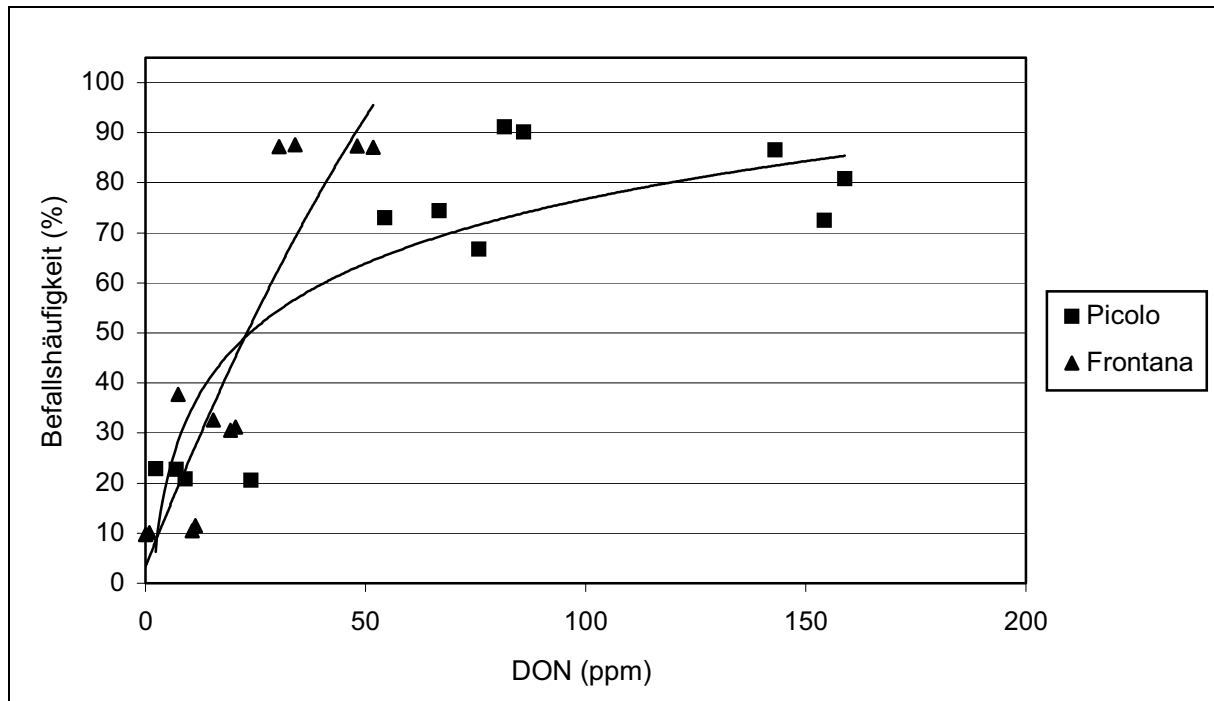


Abbildung 3.57: Korrelation zwischen dem DON-Gehalt (ppm \triangleq mg/kg TM (DON 1)) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo oder Frontana) und der Befallshäufigkeit der Ährchen nach einer künstlichen Ähren-Inokulation mit Isolat 35 (7 dpi, 21 dpi und 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 12 Mischproben in die Berechnung ein (n = 12). Jede Mischprobe setzt sich aus zwei oder drei (63 dpi) Einzelähren zusammen. Regression: Polynom 2. Grades (Frontana) oder logarithmisch (Picolo).

Die Datenpunktwolken für Picolo und Frontana unterscheiden sich in Lage und Größe. Die Datenpunkte von Frontana liegen - vergleichbar dem schwach aggressiven Isolat 36 - in einem relativ schmalen Bereich entlang der y-Achse (Abb. 3.42). Denn auch hier variierte die Befallshäufigkeit wesentlich stärker als der DON-Gehalt. Für Picolo variierte der DON-Gehalt wesentlich stärker als für Frontana. Hier war eine logarithmische Regression geeignet.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Sorte, die über lange Zeit die stärkeren Symptome zeigte, auch den höheren DON-Gehalt aufwies. Hinsichtlich des Befallsverlaufs, des Verlaufs des DON-Gehalts und der Korrelationen zwischen dem DON-Gehalt und anderen Parametern verhielt sich die schwächer anfällige Sorte (Frontana) vergleichbar dem *F. graminearum*-Isolat schwächster Aggressivität und DON-Bildung (Isolat 36).

3.7.9 Chromatogramme zur Ähren-Inokulation

Da zwischen der Matrix der Reisproben und der Ähren-Proben Unterschiede auftraten, werden hier auch beispielhaft einige Chromatogramme zur Ähren-Inokulation vorgestellt (Abb. 3.58).

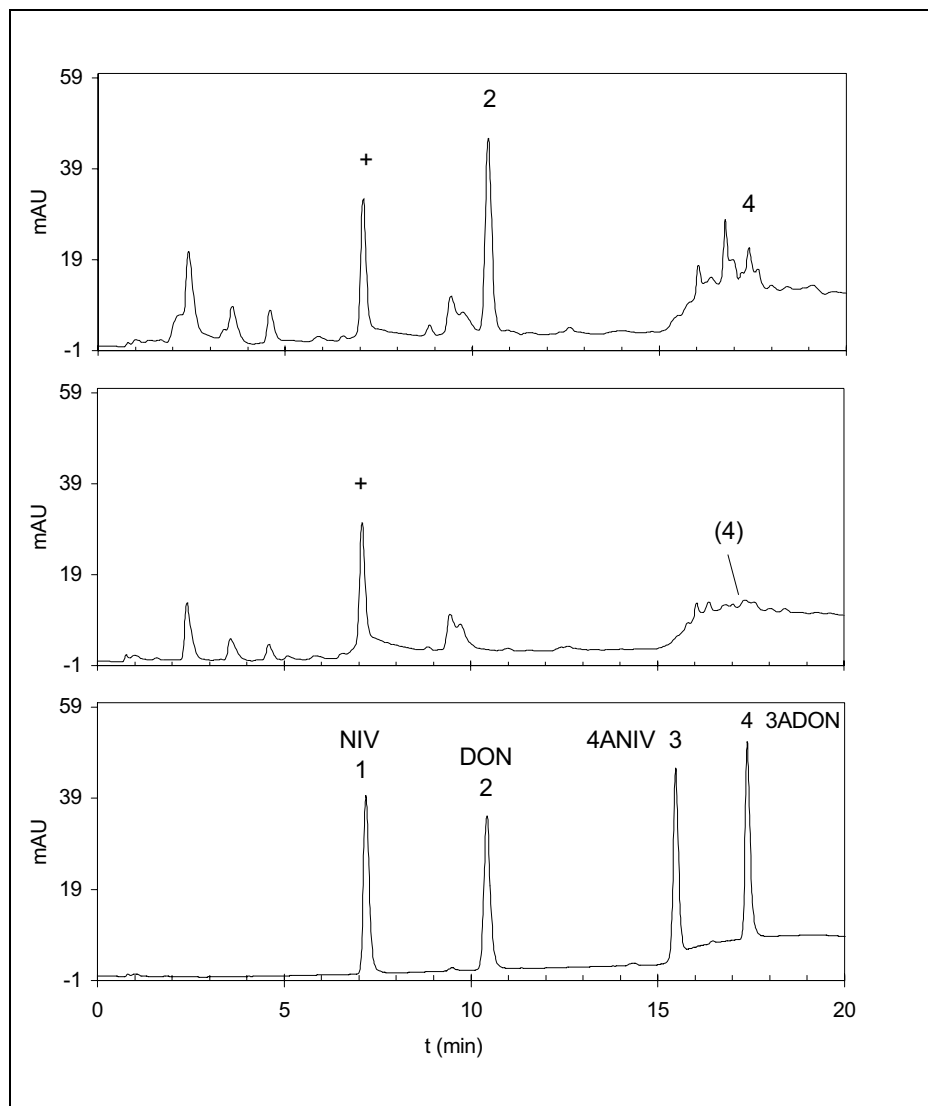


Abbildung 3.58: HPLC-Chromatogramme aus der 3. Ähren-Inokulation. HPLC-Methode M2 siehe 2.9.4.2), UV-Detektion bei $\lambda = 220$ nm. Oberes Bild: inokulierte Ähre (Isolat 35, 21 dpi), mittleres Bild: nicht inokulierte Kontrollähre (21 dpi), unteres Bild: Mykotoxin-Standard (25 ppm). Die Peaks 1-4 stellen die benannten Trichothecene dar, der mit "+" bezeichnete Peak einen Störpeak.

Die Chromatogramme entstammen der dritten Ähren-Inokulation (21 dpi, Isolat 35). Zum Vergleich wurde neben der Probe einer inokulierten Ähre die Probe der nicht inokulierten Kontrolle und ein am selben Tag gemessener Mykotoxin-Standard (25 ppm) dargestellt.

Neben deutlichen Mengen an DON und wenig ADON enthielt die inokulierte Ähre (oberes Bild) eine Vielzahl anderer Substanzen, woraus sich das charakteristische Peak-Muster ergab. Dieses Muster war prinzipiell auch in der Kontrolle wiederzufinden (mittleres Bild). Typisch für alle Ähren-Proben war der Peak bei 7.09 (mit + markiert), der eine Detektion von NIV verhinderte. Der relativ kleine ADON-Peak in der inokulierten Ähre (oberes Bild) wurde vergleichsweise schlecht vom folgenden Peak getrennt. Außerdem befand sich in der Kontrolle in der Nähe von ADON ein relativ kleiner Störpeak, der zum Teil auch in den Leerproben auftrat. Auf eine weitere Optimierung der Methode (z. B. Störpeak bei NIV) wurde verzichtet, da eine Analyse der Mykotoxine in der Ähre sich auf DON beschränkte, wobei für die Ähren-Inokulationen auch nur *F. graminearum*-Isolate vom DON-Typ verwendet wurden (2.9.7.1).

4. Diskussion

Das Auftreten von *Fusarium*-Arten im Weizen-Anbau und die damit verbundene Ertragsminderung oder Kontamination mit Mykotoxinen ist nach wie vor weltweit ein ungelöstes Problem (SCHAAFSMA *et al.* 1999, PIRGOZLIEV *et al.* 2002). *Fusarium graminearum* und den Trichothecenen vom B-Typ kommt hier besondere Bedeutung zu (siehe 1.).

Obwohl die intensive Fusarien-Forschung auf eine mittlerweile weit über dreißigjährige Tradition zurückblicken kann, sind nach wie vor viele Fragen offen.

4.1 Probenaufarbeitung und Analytik der Mykotoxine

Das methodische Spektrum der Probenaufarbeitung und Analytik der Mykotoxine ist ausgesprochen vielschichtig (KRSKA UND JOSEPHS 2001, KRSKA *et al.* 2001, LLORENS *et al.* 2002). In diesem Licht werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nun diskutiert werden. Vorerst werden nur die Trichothecene und insbesondere Deoxynivalenol (DON) diskutiert werden, anschließend Zearalenon (ZON).

4.1.1 Probenaufarbeitung

Das Probenmaterial wurde wie unter 2.8 ausführlich beschrieben aufgearbeitet. Die grob geschroteten aber durch die Fermentierung verfestigten Reisproben wurden manuell und mit einem Mixer etwas aufgelockert. Die Ährenproben lagen als fein gemahlenes Pulver vor. Nun wurden die Proben dreimal nacheinander auf einem Überkopfschüttler für jeweils 30 Min. extrahiert (Wasser/Methanol 90/10), jeweils abzentrifugiert und die Überstände der drei Extraktionen vereinigt.

Auch ALTPETER UND POSSELT (1994) verwenden eine dreifache Extraktion, um möglichst große Mengen an ADON zu gewinnen. In anderen Arbeiten wird nur eine einmalige Extraktion bei längerer Extraktionszeit durchgeführt (HOMDORK 1996: 120 Min., WEINGÄRTNER *et al.* 1997: 80 Min.). In beiden Fällen wurde als Extraktionsmittel Acetonitril/Wasser verwendet (84/16). Es ist jedoch bekannt, dass sich ein lösungsmittelabhängiges Verteilungsgleichgewicht zwischen dem Probenmaterial und dem Extraktionsmittel einstellt (nach NERNST), das sich auch bei einer Verlängerung der Extraktionszeit nicht mehr zugunsten einer höheren Extraktionsausbeute ändert. Eine mehrmalige auch kürzere Extraktion desselben Probenmaterials hingegen ermöglicht höhere Ausbeuten. Für das hier verwendete Gemisch aus Was-

ser/Methanol (90/10) konnte DON bei dreimaliger Extraktion mit fast 99 % sehr effektiv extrahiert werden (3.1.1.1, Tab. 3.1). Gegegenüber einer einmaligen Extraktion wurde eine Steigerung um 21 % erreicht.

Auffällig war, dass das Volumen des Überstandes in den einzelnen Extraktionsschritten eine Abhängigkeit von der Quellfähigkeit und der Körnung des Probenmaterials zeigte. Die eher grobkörnigen Reisproben boten ein wesentlich größeres Porenvolumen als die Ährenproben. Außerdem war bei beiden Materialien nach der dritten Extraktion relativ zum eingesetzten Extraktionsmittel gesehen mehr pipettierbarer Überstand vorhanden als in der ersten Extraktion, da das Probenmaterial schon vor Beginn der dritten Extraktion vollständig gequollen war. Um einen möglichen Fehler zu vermeiden, wurde der Überstand so vollständig wie möglich abpipettiert. Die größten Unterschiede traten zwischen den Ähren- und Reisproben auf, die Unterschiede innerhalb der einzelnen Versuche waren vergleichsweise gering.

In den meisten Veröffentlichungen wurde als Extraktionsmittel bei der Analyse auf DON oder Trichothecene allgemein ein Gemisch aus Acetonitril/Wasser verwendet (KRSKA *et al.* 2001), gefolgt von Methanol/Wasser (z. B. ALTPETER UND POSSELT 1994). Relativ selten wurde die Extraktion mit Polyethylenglykol/Wasser oder Acetonitril/Methanol durchgeführt. Auch wenn nach KRSKA *et al.* (2001) die Extraktion mit Acetonitril/Wasser der mit Methanol/Wasser hinsichtlich der Reinheit der Extrakte überlegen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der höheren Toxizität von Acetonitril eine Verwendung von Wasser/Methanol bevorzugt.

Zur Aufreinigung der Extrakte wurden Extrelut NT 3-Säulen verwendet (in Anlehnung an LAUBER 1999). 2,5 ml des Extrakts wurden aufgereinigt und dreimal mit je 5 ml Ethylacetat/Methanol (97/3) eluiert. Das Verfahren folgt dem Prinzip einer festphasengebundenen flüssig/flüssig-Extraktion. Die wässrige Probe lagert sich an die Kieselgur-Matrix. Mit dem apolaren Elutionsmittel können lipophile Substanzen aus der wässrigen Phase eluiert werden.

Die Aufreinigung der Extrakte ist ein sehr wichtiger Schritt in der Aufarbeitung der Trichothecen-Analytik, da die UV-Absorption aller B-Typ Trichothecene nicht stark ist (Extinktionskoeffizienten von 4500 bis 7500 l·cm⁻¹·Mol⁻¹, Tab. 2.9). Außerdem liegt das Maximum der UV-Absorption bei etwa $\lambda = 220$ nm in einem sehr niedrigen Bereich, in dem viele andere Stoffe ebenfalls absorbieren. Je besser die Aufreinigung ist, desto weniger Störpeaks von matrixinternen oder fermentativ gebildeten Substanzen behindern die Analyse.

Als mögliche Verfahren sind hier die Flüssig/Flüssig-Verteilung, Säulen-Chromatographie, Festphasenextraktion und die Verwendung von Gelpermeations-, Immunoaffinitäts- oder Multifunktionssäulen (KRSKA *et al.* 2001) zu erwähnen. Die Nachteile der konventionellen Flüssig/Flüssig-Verteilung ("Ausschütteln") liegen in hohem Lösungsmittelverbrauch und Schaumbildung an der Phasengrenze. Beim Extrelut-System, einer Kombination aus Flüssig/Flüssig- und Festphasen-Extraktion, treten durch die Bindung der einen flüssigen Phase an eine Festphase beide Probleme nicht auf. Die Festphasen-Extraktion ist ein Verfahren, das als "Einweg-Variante" der Säulen-Chromatographie bezeichnet werden kann. Als Säulenmaterialien werden Silica-Gel, Aluminiumoxid, Florisil, Aktivkohle und C₈- oder C₁₈-Materialien verwendet, für Trichothecene meist eine Mischung aus Aktivkohle, Aluminiumoxid und Celite (HOMDORK 1996). Eine relativ neue Methode ist die Verwendung der Multifunktionssäulen Mycosep 225. Die Säulen enthalten ein Gemisch aus verschiedenen Materialien (Aktivkohle, Celit, Ionenaustauscher-Harz und andere). Diese Reinigung ist verglichen mit den meisten anderen heute gängigen Verfahren sehr einfach von der Handhabung und zugleich sehr effektiv, was Parameter wie Nachweisgrenze und Wiederfindung betrifft (WEINGÄRTNER *et al.* 1997). Ein Nachteil ist jedoch der im Vergleich zu Extrelut NT 3-Säulen hohe Preis (etwa 2,5 bis dreimal so teuer) und die routinemäßige Verwendung von Acetonitril.

Eine dreifache Elution (je 5 ml 3 % Methanol in Ethylacetat) einer an der Extrelut NT 3-Säule gebundenen Probe erbrachte mit 88 % (8,9 ppm) des DON, das maximal mit fünf Elutionsschritten eluierbar wäre (3.1.1.2, Tab. 3.2), ein durchaus befriedigendes Ergebnis bei vertretbarem Lösungsmittelverbrauch. VUDATHALA *et al.* (1994) führten die Aufreinigung von Milchproben an Extrelut durch, wobei siebenfach mit je 3 ml (6 % Methanol in Ethylacetat) eluiert wurde. WEINGÄRTNER *et al.* (1997) verwenden Extrelut-Säulen als erste Stufe einer dreistufigen Aufreinigung.

Die Aufreinigung an Extrelut NT 3 war außerdem gut reproduzierbar (3.1.1.3, Abb. 3.4), was die mehrmalige Elution desselben Extraktes zeigte. Es traten geringe Schwankungen auf. Obwohl von den Extrelut-Säulen dieselbe Charge verwendet wurde, ist nicht auszuschließen, dass die Kieselgur-Matrix verschieden dicht oder fest gepackt war oder transportbedingte Schwankungen aufwies. Die Säulenlaufzeit wies jedenfalls teilweise deutliche Unterschiede auf, was durchaus zu einer unterschiedlichen Elutionswirkung führen könnte. AUCH WEINGÄRTNER *et al.* (1997) beobachteten bei einer Aufreinigung mit Mycosep 225-Säulen (achtfache Wiederholung), dass die Werte für einige Säulen deutlicher vom gemeinsamen Mittelwert abweichen als andere.

Da die Elution nicht ohne die folgenden Schritte der Aufarbeitung untersucht werden konnte, könnten die Schwankungen aber auch auf spätere Schritte zurückzuführen sein.

Nach der Elution wurden die Proben am Rotationsverdampfer eingengt, in Wasser/Methanol (87,5/12,5) aufgenommen und bis zur Messung an der HPLC tiefgefroren gelagert.

Diese Schritte zeigten eine ähnlich hohe Reproduzierbarkeit wie die Elution (3.1.14, Abb. 3.2). Der 5. Parallelansatz, der um -36 % vom gemeinsamen Mittelwert abweicht, dürfte ein Ausreißer-Wert sein. Die kleinen Schwankungen der übrigen Proben können verschiedene Ursachen haben. Denkbar ist, dass die Probe beim Einengen nicht nur in der Spitze des Spitzkolbens, sondern auch auf höheren Bereichen der inneren Oberfläche verteilt wurde. Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass der Rückstand in der Regel nicht ganz trocken war, sondern eine stark viskose bis sirupartige Konsistenz aufwies, vermutlich wegen des stark negativen Wasserpotentials des Rückstands oder aufgrund ölartiger Bestandteile. Beim Wiederaufnehmen des Rückstands wurde der Methanol-Anteil (62,5 µl) vor dem Wasser-Anteil auf die Probe gegeben. Auch in einem Pipettierfehler dieser kleinen Menge einer so wenig viskosen Flüssigkeit wie Methanol könnte eine Fehlerquelle liegen. Unter Berücksichtigung all dieser Faktoren ist ein Variationskoeffizient von 2,9 % (ohne Ausreißer) für die Aufarbeitungsschritte nach der Elution durchaus akzeptabel.

4.1.2 Wiederfindungsraten

Die Wiederfindungsrate zeigte für die Trichothecene DON, 3ADON, NIV und ANIV eine signifikante Abhängigkeit vom Lösungsmittelgemisch (untersucht für Reis-Matrix, 3.1.2.3.1, Tab. 3.7) und für 3ADON und ANIV auch von der Toxin-Konzentration (untersucht für Ähren-Matrix, 3.1.2.3.2, Tab. 3.8). In welches Lösungsmittelgemisch der eingengte Rückstand wieder aufgenommen wurde, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Wiederfindungsrate Wasser/Methanol 87,5/12,5 oder 0/100). Für die verwendete Methode (Extraktion mit Wasser/Methanol = 90/10, Wiederaufnahme in Wasser/Methanol = 87,5/12,5) gab es in der Reis-Matrix für DON eine Wiederfindungsrate von 78 %, für 3ADON ebenfalls von 78 %, für NIV von 32 % und für ANIV von 87 % (bei 39 ppm pro Toxin in der Probe). DON, 3ADON und ANIV zeigten bei 10 % Methanol signifikant höhere Werte als bei 85 % Methanol. Bei NIV war es umgekehrt, aber auch bei 85 % Methanol lag der Wert für die Wiederfindung mit 58 % äußerst niedrig. Mit der verwendeten Methode in der Ähren-Matrix lag die Wiederfindung bei 81 ppm für DON bei 105 %, für 3ADON bei 78 % und für ANIV bei 83 %. NIV konnte in der

Ähren-Matrix wegen eines starken Störpeaks nicht detektiert werden (Abb. 3.8). Bei einer Konzentration von 8,1 ppm war die Wiederfindungsrate für 3ADON signifikant niedriger, für ANIV signifikant höher. Zwischen Reis- und Ähren-Matrix traten auch Unterschiede auf, aber es lässt sich kein allgemeingültiger Trend erkennen, außer dass die Wiederfindung für DON in Ähren-Matrix deutlich höher war.

Diese Ergebnisse decken sich recht gut mit den aus der Literatur bekannten Werten und Beobachtungen. Die in der Literatur beschriebenen Methoden unterscheiden sich jedoch mehr oder weniger stark von der in dieser Arbeit verwendeten Extraktion und/oder Probenaufreinigung, so dass ein direkter Vergleich der Wiederfindungsraten nicht möglich ist. Daher wird die Wiederfindungsrate hinsichtlich der Größenordnung und der Tendenz der verschiedenen Effekte (Lösungsmittel, Konzentration, Matrix) diskutiert werden.

Die Werte für die Wiederfindung der Trichothecene vom B-Typ reichen von etwa 60 bis 105 % mit Extremwerten von 48 oder 128 % (KRSKA *et al.* 2001). RADOVA *et al.* (1998) erreichten für DON nur eine Wiederfindung von 38 % bei Verwendung Acetonitril/Wasser als Extraktionsmittel und einer zweistufigen Festphasen-Aufreinigung an Florisil und einer C₁₈-Säule (Weizen versetzt mit 0,5 ppm je Toxin). Für NIV betrug der Wert 20 % und für ANIV 27 %. Einen ähnlichen negativen Effekt einer Aufreinigung an C₁₈-Materialien beschreiben auch WEINGÄRTNER *et al.* (1997) und führen dies auf eine Anlagerung der Trichothecene an aktive Bindungsstellen des Säulenmaterials zurück, da dieser Effekt mit einer zunehmenden Anzahl an Aufreinigungen an derselben Säule abnahm. Mit einer Aufreinigung mittels Gel-permeations-Chromatographie (Bio-Beads S-X3) bei Extraktion mit Acetonitril/Methanol konnte in Weizen, der mit 2 ppm jedes Toxins versetzt war, eine Wiederfindungsrate von 89 % (DON), 87 % (NIV) oder 78 % (ANIV) festgestellt werden. Aber auch schon in den 80er Jahren konnten mit 97 % (DON) und 89 % (NIV) sehr gute Ergebnisse für die Wiederfindung von Trichothecenen erzielt werden. Dies gelang SANO *et al.* (1987) bei einer Extraktion mit Acetonitril/Wasser von mit Toxin (1 ppm) versetztem Weizen und einer zweistufigen Aufreinigung mit einer Florisil- und einer Sep-Pak CN-Säule. Der einzige Unterschied zur Methode von RADOVA *et al.* (1998) bestand in der Sep-Pak CN-Säule statt der C₁₈-Säule, so dass die wesentlich schlechtere Wiederfindung dort tatsächlich auf die C₁₈-Säule zurückzuführen sein könnte.

Ein sehr gutes Ergebnis bei einfacher Handhabung liefert die Verwendung der Mycosep 225-Säulen (Acetonitril/Wasser-Extraktion, mit Toxinen versetzter Weizen von 0,1 bis 2 ppm). WEINGÄRTNER *et al.* (1997) erreichen für DON, 3ADON und ANIV Wiederfindungsraten von

103 %, 96 % bzw. 97 %. Der Wert für NIV liegt mit 66 % niedriger. RADOVA *et al.* (1998) erreichen mit Mycosep 225 immerhin 76 % und 81 % für DON und ANIV und sogar 85 % für NIV. Eine dreistufige Aufreinigung bei WEINGÄRTNER *et al.* (1997) mit Extrelut-, Silica-Gel- und C₁₈-Säule führt mit 86 % (DON), 82 % (3ADON), 83 % (ANIV) und 60 % (NIV) zu deutlich niedrigeren Werten als für Mycosep 225. Die Autoren führen dies wie oben erwähnt zum einen auf die sorbierende Wirkung der C₁₈-Säule zurück, zum andern aber darauf, dass mit Mycosep 225 nur ein Aufreinigungsschritt vorgenommen wird und so weitere mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Dies zeigt sich auch an einer deutlich geringeren Streuung der Ergebnisse der Aufarbeitung mit Mycosep-225 (WEINGÄRTNER *et al.* 1997).

Für Arbeiten, die eine Extraktion mit wässrigem Methanol vornehmen, ist eine Wiederfindungsrate für Trichothecene vom B-Typ von etwa 70 bis 120 % angegeben (KRSKA *et al.* 2001).

Bei der Aufreinigung ist es offenbar wichtig, unerwünschte Interaktionen der Toxine mit dem Säulenmaterial zu vermeiden und andererseits möglichst wenige Schritte zu verwenden. Dies scheint in der vorliegenden Arbeit gelungen zu sein (3.1.2.3.2, Tab. 3.8), denn mit der Extraktion in wässrigem Methanol und der einstufigen Aufreinigung an Extrelut konnte für DON eine Wiederfindungsrate von 105 % erzielt werden (Weizen mit 81 ppm DON versetzt), was durchaus den Werten von WEINGÄRTNER *et al.* (1997) mit einer Aufreinigung an Mycosep 225 gleichwertig ist (103 %). Die Werte für 3ADON und ANIV lagen mit 80 % bzw. 83 % ebenfalls im selben Bereich.

Allerdings wurden die Weizen-Proben in der vorliegenden Arbeit mit einer wesentlich höheren Toxinmenge versetzt (81 ppm verglichen mit 0,1 bis 2 ppm). Die Wiederfindungsraten für mit 8,1 ppm versetzte Weizenproben waren für ADON mit 55 % signifikant niedriger. Aber weder bei WEINGÄRTNER *et al.* (1997), STRATTON *et al.* (1993) noch in der hier diskutierten Arbeit (Tab. 3.8) konnte ein eindeutiger Trend zwischen der Toxin-Konzentration in den künstlich mit Toxin kontaminierten Proben und der Wiederfindung gefunden werden, der für alle Toxine gelten würde. MATEO *et al.* (2001) allerdings konnten zeigen, dass mit steigender Toxinkonzentration in künstlich mit Toxin versetzten Getreideproben die Wiederfindungsrate stetig abnahm. Dies galt bei einer Extraktion mit Acetonitril/Wasser (Aufreinigung an Mycosep) für DON, NIV und 3ADON in allen untersuchten Produkten (Weizen, Mais, Reis).

Der Einfluss des Extraktionsmittels auf die Wiederfindungsrate (3.1.2.3.1, Tab. 3.7) findet sich auch in der Literatur. Allerdings kann der signifikante Unterschied, dass bei höherem

Methanol-Anteil (85 statt 10 %) die Trichothecene DON und 3ADON eine schlechtere Wiederfindungsrate zeigen, nicht bestätigt werden (STRATTON *et al.* 1993, MATEO *et al.* 2001). Bei STRATTON *et al.* (1993) zeigte DON bei 85 % Methanol in Wasser sogar mit 90 % eine deutlich höhere Wiederfindungsrate als in 50 % Methanol (< 5 %). In der vorliegenden Arbeit lag der Wert bei 85 % Methanol nur bei 61 % (Tab. 3.7).

Offensichtlich hat das Lösungsmittel einen teils sehr starken Einfluss auf den Extraktionserfolg, in Abhängigkeit von beispielsweise der Polarität der jeweiligen Mykotoxine. Die polaren Trichothecene zeigten in stärker wässrigem Lösungsmittel eine signifikant höhere Wiederfindungsrate, während das apolare Zearalenon (ZON) in stärker methanolischer Lösung signifikant besser extrahiert wurde. Möglicherweise spielt ebenfalls das Quellungsverhalten der Matrix an dieser Stelle eine Rolle, denn die Extraktion wurde mit trockenem oder zumindest noch quellfähigem Probenmaterial (in diesem Fall Reis-Matrix) durchgeführt. Wenn nun nur 15 % Wasser in dem Extraktionsmittel enthalten sind, dann wird vermutlich ein großer Teil des Wassers von der Matrix durch Quellung aufgenommen. Die eher polaren Typ B-Trichothecene werden mit dem Wasser von der Matrix aufgenommen und stehen der Extraktion nicht in dem Ausmaß zur Verfügung, da das die Matrix umgebende Lösungsmittel apolarer ist als das von der Matrix sorbierte. Durch diesen Effekt könnte sich bei niedrigem Wasseranteil im Lösungsmittel ein Verteilungsgleichgewicht einstellen, durch das die Wiederfindungsrate für Trichothecene geringer als für höhere Wasseranteile ist. Allerdings müsste dieser Effekt bei STRATTON *et al.* (1993) ebenso auftreten. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen für 85 % Methanol aus Tab. 3.7 und STRATTON *et al.* (1993) könnten ihre Ursache jedenfalls in der verschiedenen weiteren Aufreinigung haben, denn STRATTON *et al.* (1993) verwenden statt der Extrelut NT 3-Säule eine Aktivkohle-Aluminiumoxid-Säule.

Ein Vergleich von Tab. 3.7 und Tab. 3.8 zeigt, dass die Wiederfindung von DON in der Ähren-Matrix deutlich höher ist als in der Reis-Matrix (102 % bis 105 % gegenüber 78 %). Einen klaren Effekt der Matrix auf die Wiederfindung bestätigen RADOVA *et al.* (1998). Allerdings ist die Wiederfindung für DON und ANIV in Reis höher als in Gerste, Roggen, Hafer, Mais und Weizen-Mehl. STRATTON *et al.* (1993) und MATEO *et al.* (2001) können keinen klaren Unterschied zwischen Weizen und Gerste bzw. Weizen, Reis und Mais zeigen. Die beobachteten Unterschiede könnten möglicherweise auf einen Unterschied in der Größe der Körnung des Probenmaterials zurückzuführen sein. Die Ähren-Proben waren fein gemahlen, die Reis-Proben nur geschrotet. Dies wirkt sich sowohl auf die Pipettierbarkeit der Überstände bei der Extraktion (s.o.) als auch auf die sorbierende Oberfläche der Probe aus.

Auffällig war weiterhin, dass die Wiederfindung von NIV sehr niedrig war (32 bis 58 % je nach Methode) und sich hinsichtlich der Lösungsmittel-Effekte anders als die drei übrigen Typ B-Trichothecene verhielt (Tab. 3.7). Auch dieses Phänomen lässt sich bei vielen, aber nicht bei allen anderen Arbeiten wiederfinden. Keine Unterschiede zwischen NIV und den anderen untersuchten Trichothecenen oder Unterschiede ohne eindeutigen Trend konnten SANO *et al.* (1987) und KOTAL *et al.* (1999) feststellen. Bei WEINGÄRTNER *et al.* (1993) finden sich für NIV Werte von 50 bis 70 % gegenüber 74 bis 106 % für die übrigen Trichothecene vom B-Typ (DON, 3ADON, 15ADON, ANIV). Die Aufarbeitung erfolgte ebenso wie bei RADOVA *et al.* (1998) mit Acetonitril/Wasser und Mycosep 225. Letztere Arbeitsgruppe erhielt aber keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Wiederfindungsrate von DON und NIV. So war die Wiederfindung von DON in Reis, Hafer und Gerste tendenziell besser, in Weizen, Roggen und Mais aber die von NIV. Bei MATEO *et al.* (2001) war die Wiederfindung von NIV sowohl in Weizen als auch in Mais und Reis teils deutlich schlechter als die von DON oder 3ADON (z. B. für Mais bei 0,025 ppm: 96,8 % (DON) gegenüber 72,2 % (NIV).

Ein von den anderen B-Typ-Trichothecenen abweichendes Verhalten von NIV hinsichtlich des Extraktionsverhaltens und der Wiederfindung könnte seine Erklärung in den Eigenschaften des NIV-Moleküls haben. NIV ist von den hier untersuchten Typ B-Trichothecenen eindeutig das polarste. Hierdurch treten möglicherweise Wechselwirkungen mit Säulenmaterialien oder anderen Oberflächen (z. B. von Glasgeräten) auf, die bei den weniger polaren Molekülen unterbleiben. Auch ein Verlust an NIV beim Wiederaufnehmen des Rückstandes nach dem Eindampfen durch Lösungsmittel-Effekte wäre denkbar. Bei der hier verwendeten Methode, bei der die Extrelut-Säulen mit dem sehr apolaren Ethylacetat (mit 3 % Methanol) eluiert werden (2.8.3) ist vermutlich viel NIV wegen seiner hohen Polarität an die polare Phase der Extrelut-Säule gebunden geblieben (WALKER UND MEIER 1998).

4.1.3 Analytik

Die Mykotoxine (Trichothecene vom B Typ einschließlich ZON) wurden mit RP-HPLC und UV-Detektion analysiert (2.9). Es wurden eine Merck LiChrospher- oder Waters Spherisorb-Säule (C₁₈) mit einem mehrstufigen Wasser/Methanol-Gradienten verwendet (Start bei 95/5). Je nach Matrix wurde der Endwert von 55 % Wasser (Ähre) bzw. 60 % Wasser (Reis) nach 25 Min. bzw. 19 Min. erreicht. Auch von WALKER UND MEIER (1998) wurde ein mehrstufiger Gradient verwendet. Die Trichothecene wurden bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ (Dioden-Array-Detektor)

gemessen. Durch die Dioden Array-Detektion war es möglich, die falsch positive Identifikation einiger Trichothecen-Peaks über die zugehörigen Spektren qualitativ zu negieren (Abb. 2.4).

Zur Analytik der Trichothecene sind aus der Literatur neben der HPLC die Gaschromatographie (GC), die Dünnschichtchromatographie (DC) und ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bekannt (RADOVA *et al.* 1998).

In der GC werden die Trichothecene in derivatisierter Form (meist als Trimethylsilyl-Derivate) getrennt und mittels ECD (electron-capture detection), Massenspektrometrie (MS) oder Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) quantifiziert. In der GC können je nach Derivatisierung und Detektion sehr gute Nachweisgrenzen von 0,005 bis 0,05 ppm erreicht werden. Ein Nachteil der GC liegt im hohen Wartungsbedarf der Geräte und den hohen Anschaffungskosten (KRSKA *et al.* 2001). Die DC ist eines der ältesten Verfahren für die Trichothecen-Analytik, das zur Visualisierung der Substanzen verschiedene Sprüh-Reagenzien verwendet (z. B. AlCl_3). Mit einer Nachweisgrenze von 0,02 bis 0,3 ppm ist das vergleichsweise kostengünstige und einfach zu handhabende Verfahren nicht nur im Screening, sondern auch in der quantitativen Analytik durchaus eine zu erwägende Alternative (KRSKA *et al.* 2001). ELISA-Tests zeigten in zwei Studien signifikant höhere Messwerte als HPLC- oder GC-Methoden (WEINGÄRTNER *et al.* 1997, JOSEPHS *et al.* 2001). Die Nachweisgrenze ist für die empfindlichsten Tests sehr niedrig (0,0003 bis 0,001 ppm). In diesen Tests wurden die Antikörper allerdings gegen 3,7,15-Triacetyl-DON gewonnen, so dass der Test nicht zwischen DON und seinen Acetyl-Derivaten 3ADON, 15ADON und 3,15-Diacetyl-DON unterscheidet. Andere ELISA-Tests haben mit immerhin 0,02 bis 0,3 ppm eine etwas schlechtere Nachweisgrenze. ELISA-Tests ebenso wie andere immunologische Verfahren (RIA, radio immuno assay, WEINGÄRTNER *et al.* 1997) sind für Screening-Test mit großen Probenmengen gut geeignet, aber in der Quantifizierung von DON nur begrenzt einsetzbar. Als weiteres spezielles Verfahren zur Trichothecene-Analyse wäre die SFC (supercritical fluid chromatography) zu nennen, bei der sehr dünne Säulen (50 oder 100 μm innerer Durchmesser) mit stark vernetztem Silica-Gel als stationärer Phase verwendet werden können (YOUNG UND GAMES 1992).

Für die HPLC gibt es neben der reinen UV-Detektion bei etwa 220 nm und neben der hier verwendeten Detektion mit DAD noch mehrere Möglichkeiten zur Derivatisierung vor oder nach der Trennung auf der Säule, die die Nachweisgrenze wesentlich verbessern. Eine Detektion erfolgt in diesem Fall mittels Fluoreszenz-Detektor oder im längerwelligen UV-Bereich ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Letzteres ist bei MAYCOCK UND UTLEY (1985) der Fall, die eine Methode zur

Vorsäulen-Derivatisierung anwenden, bei der durch eine chemische Reaktion die Trichothecen-p-nitrobenzoate entstehen. In den letzten Jahren hat eine Nachsäulenderivatisierung an Bedeutung gewonnen, bei der die Trichothecene in einer zweistufigen Reaktionseinheit durch Abspaltung von Formaldehyd nach einer Hantzschschen Reaktion in ein fluoreszierendes Produkt umgewandelt werden (SANO *et al.* 1987, HOMDORK 1996, LEPSCHY 2000). Die Nachweisgrenze für diese quantitative Methode liegt bei etwa 0,02 ppm, für eine Kopplung aus HPLC und MS bei 0,001 bis 0,04 ppm (KRSKA *et al.* 2001). Für die quantitative Analytik mittels HPLC und UV-Detektion wird hier eine Nachweisgrenze von 0,05 bis 1,6 ppm für B-Typ-Trichothecene angegeben.

Mit 0,1 ppm als Nachweisgrenze liegt die hier vorliegende Arbeit also voll im erwarteten Bereich, wobei das Verhältnis von Peak-Höhe zum Rauschen der Basislinie sogar mindestens 5:1 betrug (3.1.2.2, Abb. 3.9). Durch die Verdünnungseffekte während der Extraktion entspricht dies im schlechtesten Fall 0,54 ppm für die DON-Menge in der Ährenmatrix. In der Literatur wird zurecht darauf hingewiesen, dass die Nachweisgrenze durch matrixbedingte Störpeaks wesentlich verschlechtert werden kann (Faktor 5-20). Dies gilt vor allem für die störanfällige Messung im niedrigen UV-Bereich (ANONYMOUS 1986).

In der Ähren-Matrix war eine chromatographische Trennung von NIV von einem begleitenden Störpeak unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich. Diese Problematik ist aus der Literatur bekannt, da NIV aufgrund seiner starken Polarität eine meist nur geringe Retentionszeit aufweist und gemeinsam mit vielen Matrix-Inhaltsstoffen eluiert. Eine Trennung geht in aller Regel zulasten einer längeren Analysenzeit (LEPSCHY 2000). Probleme in dieser Hinsicht treten auch bei GC-ECD auf (KOTAL *et al.* 1999). Eine Trennung der Acetyl-Derivate von DON (3ADON und 15ADON) ist generell auch mit einem Wasser/Methanol-Gradienten möglich, würde die Retentionszeit aufgrund ähnlicher Polaritätseigenschaften aber sehr verlängern. Da in einer Messung neben den Trichothecenen auch noch das wesentlich apolarere ZON bestimmt werden sollte (Retentionszeit bei etwa 24 Min.), konnte eine weitere Verlängerung der Messzeit aufgrund der hohen Probenzahl nicht in Kauf genommen werden. WALKER UND MEIER (1998) gelingt eine Trennung von 3ADON und 15ADON mit HPLC (UV-Detektion mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser). Auch mit Wasser/Tetrahydrofuran ist eine Trennung möglich (LANIN *et al.* 1990). In beiden Fällen wurde ZON nicht analysiert.

Auch die Genauigkeit der Kalibrierkurven für die Trichothecene stimmt gut mit denen aus der Literatur überein (3.1.2.1, Tab. 3.5). VISCONTI UND BOTTALICO (1983) trennen NIV, DON,

ANIV und 3ADON ebenfalls mit einem Wasser/Methanol-Gemisch und messen die Trichothecene mittels UV-Detektion. Für einen Bereich von 5 ng bis 410 ng liegen alle Werte für R^2 deutlich über 0,99. Für den Bereich von 0 ng bis 1000 ng (Tab. 3.5) liegt das Bestimmtheitsmaß für alle Toxine ebenfalls in diesem Bereich.

Über die Stabilität und Zuverlässigkeit von Trichothecen-Standards ist aus der Literatur wenig bekannt. Dies gilt insbesondere für die Acetyl-Derivate. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung verschiedener Lagertemperaturen auf einen Mykotoxin-Mischstandard (DON, 3ADON, NIV, ANIV, ZON) untersucht (3.1.1.5, Tab. 3.3). Bei einer Lagerung bei 4 °C ist verglichen mit einer Lagerung bei -20 °C schon nach acht bis neun Tagen eine deutliche Veränderung festzustellen. Die Toxin-Konzentrationen haben sich im Verhältnis zueinander verändert, und zwar zeigen die nicht-acetylierten Formen (DON, NIV) eine deutliche Zunahme, die acetylierten Formen eine deutliche Abnahme (3ADON, ANIV) der Konzentration. ZON zeigte keinen klaren Effekt. Bei den Trichothecenen ist eine saure Hydrolyse der acetylierten Formen zu vermuten, die auch beim Verlauf der Trichothecenbildung *in vitro* (4.2) eine Rolle spielt (LEPSCHY 1999).

Unklar ist, inwieweit sich die Standards acetylierter Trichothecene bei niedrigeren Lagertemperaturen verändern. Aus der Literatur sind hierzu keine Daten bekannt. Wahrscheinlich spielt hier außer der Temperatur noch die Dichtigkeit der Gefäße eine Rolle, da das CO₂ der Atmosphäre zu einer verstärkten Ansäuerung und somit verstärkter Hydrolyse führen könnte. Eine Test-Messung eines 13 Monate alten Standards zeigte eine beträchtliche Abweichung vom typischen Muster, wobei wiederum die Signale der acetylierten Trichothecene zu niedrig lagen (2.9.5, Anhang A.11). Ein Kontrollversuch zeigte, dass der Trend zur Abnahme der acetylierten und zur Zunahme der nicht acetylierten Formen nach einer etwa zweimonatigen Lagerung bei -70 °C nicht nachzuweisen war (3.1.1.5, Tab. 3.4). Denkbar wäre auch, dass eine Veränderung in den Standards schneller als in den Proben vonstatten geht, da eine Pufferung des pH-Werts in dem reinen Lösungsmittel verglichen zu den trotz der Aufreinigung deutlich komplexeren Proben nicht möglich ist. Die Proben des Ähren-Versuchs 3 und 4 und des Reis-Versuchs 2 wurden zur Sicherheit bei -70 °C statt bei -20 °C gelagert und mit gespeicherten Daten frischer Standards (Alter ca. eine Woche) quantifiziert.

DON, NIV selbst werden in der Literatur als sehr stabil beschrieben. SHEPHERD UND GILBERT (1988) fanden heraus, dass eine Lagerung eines DON-Standards (100 ppm) bei -18 °C (2. bis 18. Monat bei -36 °C) für bis zu 27 Monate in Ethylacetat, Acetonitril oder Methanol/Chloroform (5/95) keine signifikante Veränderung mit sich brachte. Diese Ergebnisse

konnten von WIDESTRAND UND PETTERSSON (2001) für DON und NIV bestätigt werden. In dieser Studie wurden DON und NIV (10,5 ppm) für 24 Monate bei -18 °C gelagert und kein Abbau konnte nachgewiesen werden, weder in Acetonitril, Ethylacetat noch als eingedampfter Rückstand. Im Gegensatz zu SHEPHERD UND GILBERT (1988) zeigte hier bei höheren Temperaturen ein Lösen in Acetonitril (statt Ethylacetat) die besseren Stabilitätswerte.

Diese vom analytischen Standpunkt her erfreulich hohe Stabilität führt allerdings dazu, dass auch durch gängige Bearbeitungsprozesse pflanzlicher Rohstoffe bei der Nahrungszubereitung nicht notwendigerweise ein relevanter Abbau der Substanzen zu erwarten ist. KAMIMURA (1989) berichtet, dass bei haushaltsüblichen Kochvorgängen (120 °C, 45 Min.) weder bei Trichothecen vom NIV-Typ, vom T2-Typ noch bei ZON ein Abbau zu verzeichnen ist. Bei 150 °C (45 Min.) findet ein tendenzieller Abbau der Trichothecene, nicht aber von ZON statt. Nach WOLF UND BULLERMANN (1998) ist diese Stabilität von DON pH-abhängig. Anders als die acetylierten Formen ist DON in wässrigem Milieu bei pH = 4 oder 7 am stabilsten und zeigt auch hier bei 120 °C nach 60 Min. keine Abnahme der Konzentration. Bei pH = 10 war bereits nach 30 Min. ein fast vollständiger Abbau zu verzeichnen (120 °C). Bei 170 °C war bei allen getesteten pH-Werten schon nach 15 Min. eine signifikante Abnahme zu beobachten.

4.1.4 Zearalenon (ZON)

ZON wurde in dieser Arbeit im Reis-Versuch 2 gemessen. Sowohl die Extraktion als auch die Probenaufreinigung waren für die Trichothecene, nicht aber für ZON optimiert worden. Dies resultierte in einer für ZON nur sehr niedrigen Wiederfindungsrate von 6 % (3.1.2.3.1, Tab. 3.7). Da ZON sehr viel apolarer als die Trichothecene ist (Abb. 1.1), war eine gemeinsame Aufarbeitung, die für beide Toxingruppen befriedigende Ergebnisse liefert, nicht zu erwarten. Eine getrennte Probenaufarbeitung war generell aus Zeitmangel und teilweise aus Mangel an Probenmaterial nicht möglich, so dass ein Kompromiss gefunden werden musste. Da ZON über keine akute Toxizität verfügt (KRSKA UND JOSEPHS 2001), wurde angenommen, dass dieses Toxin auch für die der Arbeit zugrundeliegende Fragestellung eine untergeordnete Rolle spielen würde, obwohl die Toxizität für Kallus-Gewebe von Weizen prinzipiell nachgewiesen ist (MORARU *et al.* 1997) und ZON auch als Entkoppler an pflanzlichen Mitochondrien wirken (MACRI *et al.* 1996) kann. Es wurde eine Aufarbeitungsmethode gewählt, die in erster Linie gute Ergebnisse für die Trichothecene lieferte. Durch die Wahl eines geeigneten HPLC-

Gradienten (2.9.4.2, Tab. 2.11) war eine nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Analyse von ZON möglich. Trotz der niedrigen Wiederfindungsrate traten in der Untersuchung der ZON-Bildung der *Fusarium*-Isolate deutliche und teilweise signifikante Unterschiede auf (Abb. 3.20). Dennoch sind die Ergebnisse für ZON im Licht der niedrigen Wiederfindungsrate zu betrachten, ähnlich den Ergebnissen halb-quantitativer Methoden. So wurden beispielsweise einige der Messwerte geringerer Konzentration unter Angabe des errechneten Wertes in die Gruppe "< 5 ppm" eingeordnet (2.9.5).

Zur Analyse wurde die Detektion mittels RP-HPLC und Fluoreszenz-Detektion ($\lambda_{\text{Exc}} = 274$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 470$ nm) verwendet. Da es sich bei dem Fluoreszenz-Detektor um ein Leihgerät handelte, wurden vereinzelt auch Messungen mit dem DAD im UV-Bereich durchgeführt ($\lambda = 236$). Die Messung mit dem Fluoreszenz-Detektor erbrachte eine deutlich höhere Spezifität als eine Messung im UV-Bereich, aber die Intensität des Signals war verglichen mit dem UV-Signal vergleichsweise niedrig (2.9.5, Abb. 2.3), vermutlich aufgrund einer relativ geringen Quantenausbeute und eines geringeren Extinktionskoeffizienten von ZON bei $\lambda = 274$ verglichen mit $\lambda = 236$ nm (Formel 2.5, Tab. 2.9). TRENHOLM *et al.* (1984) jedoch berichten, dass die Fluoreszenz-Methode die empfindlichere ist. Hier fand allerdings auch eine Anregung bei $\lambda = 236$ nm statt, was aufgrund einer starken Baseline-Drift im Bereich von ZON in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war (2.9.5). Bei der Wiederfindungsrate zeigte sich hinsichtlich einer Detektion über Fluoreszenz oder UV-Detektion (DAD) in Reis-Proben kein klarer Unterschied (Tab. 3.7), was in der Literatur für Reis-Proben bestätigt wird (LLORENZ *et al.* 2002).

Auch in der Literatur gilt die Analyse von ZON mit HPLC und Fluoreszenz-Detektion als die gängigste Methode (KRSKA UND JOSEPHS 2001), die in einer Vergleichsstudie von 18 von insgesamt 28 Labors gewählt wurde, gefolgt von ELISA-Test-Verfahren (5 Labors, JOSEPHS *et al.* 2001). Als Extraktion wurde von den meisten Labors ein Gemisch aus Acetonitril/Wasser (z. B. 72/25, SCHUHMACHER *et al.* 1998) gewählt. Bei der Aufreinigung gilt eine mehrstufige Flüssig/Flüssig-Verteilung ("Ausschütteln") als konventionelle Methode, bei der allerdings große Erfahrung und Routine notwendig sind, um eine Zersetzung von ZON während einem der Extraktionsschritte in stark alkalischem Milieu zu verhindern. Viele Labors haben sich daher auf eine einfachere, aber auch kostenintensivere Anwendung von Immunoaffinitätssäulen umgestellt (SCHUHMACHER *et al.* 1998, KRSKA UND JOSEPHS 2001).

4.1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist zu sagen, dass trotz jahrelanger intensiver Forschung im Bereich der Analytik der *Fusarium*-Mykotoxine noch kein befriedigender Zustand erreicht ist (KRSKA *et al.* 2001). Dies wird am deutlichsten daran, dass in einer 1998 durchgeführten internationalen Vergleichsstudie von insgesamt 28 Labors auch nach Eliminierung der Ausreißer-Werte noch große Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Labors für eine Messung von Mais- und Weizen-Proben auftraten, die natürlich oder künstlich mit ZON und DON kontaminiert worden waren. Auch die Varianz zwischen zwei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen desselben Labors war zum Teil sehr groß. Für ZON schwankte der Variationskoeffizient von 28 bis 41 %, für DON von 32 bis 38 % (JOSEPHS *et al.* 2001). In dieser Studie arbeiteten im Gegensatz zu einem vergleichbaren Versuch (SCHUHMACHER *et al.* 1997), bei dem die Variation geringer war, alle Labors mit ihren eigenen Standards, was eine mögliche Fehlerquelle ist. Außerdem wurde eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der verwendeten Methode festgestellt, wobei die Ergebnisse der ELISA-Verfahren für DON signifikant höher lagen (JOSEPHS *et al.* 2001). Eine bessere Vergleichbarkeit und größere Zuverlässigkeit der Ergebnisse wäre wünschenswert und könnte durch eine stärkere Standardisierung (Wellenlänge, Extinktionskoeffizient) und Versorgung mit zertifiziertem Referenzmaterial erreicht werden (JOSEPHS *et al.* 2001, KRSKA *et al.* 2001).

4.2 Taxonomische Einordnung mittels PCR

In der *Fusarium*-Taxonomie gibt es weitverbreitete Standard-Werke, die Kriterien für eine mikroskopische Bestimmung aufgrund morphologischer Strukturen oder Kultur-Charakteristika liefern (BOOTH 1971, GERLACH UND NIRENBERG 1982, NELSON *et al.* 1983, BURGESS *et al.* 1994). Die verwendeten Merkmale beinhalten die Färbung der Kulturen oder die Ausprägung des Myzels, die Wachstumsgeschwindigkeit, die Art, Form und Größe gebildeter Sporen oder sogar den Geruch auf speziellen Medien. Da all diese Merkmale sehr variabel sind und die Beurteilung einiger Kriterien (z.B. Farbe, Geruch) objektiv nur schwer möglich ist, ist die taxonomische Einordnung alleine aufgrund solcher Merkmale mit Unsicherheiten behaftet. Selbst erfahrenen Wissenschaftlern können durchaus Fehlbestimmungen unterlaufen. So galt beispielsweise *Microdochium nivale* lange als potentieller Trichothecen-Bildner, da ein *F. tricinctum*-Isolat fälschlicherweise als *Microdochium nivale* eingeordnet

worden war (GAMS 1989). Auch ENGELHARDT *et al.* (1986) bestimmten ein *F. graminearum*-Isolat fälschlicherweise als *F. tricinctum*.

Daher ist die Entwicklung anderer taxonomischer Methoden unternommen worden. Eine computergestützte Bildanalyse ermöglichte die zuverlässige Bestimmung von Makrokonidien (GOTTWALD *et al.* 2001). Allerdings waren definierte Kulturbedingungen nötig und es wurden nur sechs Arten einbezogen. Ein weiterer Ansatz in der *Fusarium*-Taxonomie ist die Analyse von Isoenzym-Mustern (ALTOMARE *et al.* 1997). Mit dieser Methode können sowohl inter- als auch intraspezifische Vergleiche vorliegender *Fusarium*-Isolate durchgeführt werden, so wie es auch durch die RAPD-PCR-Technik (random amplified polymorphic DNA-PCR) möglich ist (YLI-MATTILA *et al.* 1996, NICHOLSON *et al.* 1998). Auch eine in dieser Arbeit verwendete PCR-Methode mit artspezifischen Primern wird vielfach angewendet (PARRY UND NICHOLSON 1996, DOOHAN *et al.* 1998). Die Stärke einer solchen PCR-basierten Technik beruht auf der hohen Empfindlichkeit und der hohen Spezifität. Beides kann durch das verwendete PCR-Protokoll optimiert werden (Anhang A 7). So können auch kleine Verunreinigungen in *Fusarium*-Kulturen erkannt werden, die anhand bloßer Kultur-Charakteristika beispielsweise wegen der starken Dominanz einer Art nicht festgestellt werden könnten. YODER UND CHRISTIANSON (1998) können so sechs Arten der *Fusarium*-Sektion *Discolor* unterscheiden, zu der auch *F. culmorum* und *F. graminearum* gehören. Eine mögliche Fehlerquelle dieser Technik sind dennoch Kreuzreaktionen mit anderen Arten aufgrund mangelnder Spezifität der Primer oder suboptimaler PCR-Bedingungen.

In der vorliegenden Arbeit liegt eine hohe Übereinstimmung zwischen den morphologisch bestimmten und mit PCR-Technik analysierten Arten der Isolate vor. Bei den *F. graminearum*-Isolaten wurde die morphologische Bestimmung oder eine Einordnung mittels Isoenzym-Muster (LEPSCHY 1998) bestätigt (3.2.2, Abb. 3.10). Lediglich einige Verunreinigungen mit *F. culmorum* wurden durch die PCR-Technik deutlich, die vorher nicht festgestellt worden waren. Hiervon war keines der Einspor-Isolate betroffen. Die drei Isolate 44, 45, 46, die vorher allgemein in die Sektion *Discolor* eingeordnet worden waren, konnten als *F. culmorum*-Arten identifiziert werden, wenn auch z. T. mit *F. graminearum*-Anteilen (Abb. 3.11).

Das PCR-Produkt der Isolate 36, 40, 49 und 50 zeigte eine etwas längere Laufstrecke als die der übrigen *F. graminearum*-Isolate, was für ein etwas kürzeres Fragment spricht (Abb. 3.10). Da es sich bei den Isolaten 36 und 49 bzw. 40 und 50 um jeweils dasselbe Isolat (vom Ursprung her) handelt, das aber durch verschiedene Bezugsquellen erhalten wurde (Anhang

A.6), sind letztlich nur zwei Isolate hiervon betroffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Beobachtung nicht weiter untersucht.

Es zeigte sich ebenfalls eine sehr leichte falsch-positive Anzeige des Fc-35f/r-Primer-Paares beim Kontroll-Isolat von *F. poae* (3.2.2). Dieser Primer wurde in der Literatur als für *F. culmorum* spezifisch beschrieben (SCHILLING 1996). Banden auf dem Gel, die eine ähnliche Intensität zeigten, sollten darum nicht überinterpretiert werden (Abb. 3.11). Daher wurden die äußerst schwachen Banden bei den Isolaten 8, 9, 10 und 13 als falsch positiv ignoriert. Auch die Bande von Isolat 38, die noch gerade als positives Signal akzeptiert wurde (als schwache Verunreinigung mit *F. culmorum*) befindet sich am Rande der Auflösung dieser Methode. Das Signal bei den Isolaten 41 und 42 war auch ziemlich schwach, aber schon deutlich intensiver als bei dem *F. poae*-Kontroll-Isolat, so dass hier allem Anschein nach zurecht von einer schwachen Verunreinigung gesprochen werden kann, wenn auch unter Kenntnis der Grenzen dieser Methode.

Einen weiteren Sonderfall stellte das Isolat 51 dar. Schon von den Kultur-Charakteristika wies es einen anderen Wuchs auf als für *F. graminearum* typisch (sehr dichtes, samtiges Myzel, relativ langsam wachsend mit klar begrenztem Rand auf PDA) und neben ganz wenigen Makrokonidien, die *F. graminearum* ähnlich waren, traten in Sporensuspensionen sehr viele kleine leicht zitronenförmige Konidien auf. Ein Test auf *F. poae*, eine Art, die über solche Mikrokonidien verfügt, verlief allerdings negativ (3.2.2), die Verunreinigung mit *F. graminearum* konnte aber bestätigt werden (Abb. 3.10). Der Test auf *F. avenaceum* verlief eindeutig positiv. Überraschend ist jedoch, dass *F. avenaceum* deutlich längliche, wenn auch kleine Mikrokonidien bildet, fast kugelige Formen in dieser Fülle hingegen aber eher untypisch sind. Eine mögliche Erklärung wäre, dass noch eine weitere nicht detektierte *Fusarium*-Art in der Misch-Kultur vorliegt oder aber ein gattungsfremder Pilz als Kontaminante auftritt. Möglicherweise treten bei diesem eigentlich für *F. avenaceum* typischen Primerpaar (Fa-f/r, LEES 1995) auch Kreuzreaktionen auf. Für ein anderes für *F. avenaceum* konstruiertes Primerpaar wird berichtet, dass eine Unterscheidung zwischen *F. avenaceum* und *F. tricinctum* nicht möglich ist (CHELKOWSKI *et al.* 1999). Auch TURNER *et al.* (1998) erwähnen dieses Problem. Also besteht durchaus die Möglichkeit, dass es sich bei Isolat 51 um ein *F. tricinctum*-Isolat handelt, da die beobachteten mikroskopischen und morphologischen Merkmale der Kultur deutlich eher *F. tricinctum* als *F. avenaceum* ähneln und offenbar eine große genetische Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Arten besteht (TURNER *et al.* 1998).

Mit spezifischen PCR-Techniken ist es nicht nur möglich, *Fusarium*-Isolate der taxonomischen Art zuzuordnen. Auch an einer Detektion trichothecenbildender *Fusarium*-Arten wird seit einiger Zeit gearbeitet (KNOLL *et al.* 2000), an einer quantitativen Analyse der DNA (DOOHAN *et al.* 1999) und an einer Korrelation zwischen der DNA-Menge trichothecenbildender *Fusarium*-Arten und der Toxin-Belastung des Getreides, wobei SCHNERR *et al.* (2002) deutliche Zusammenhänge fanden. Auch die *F. graminearum*-Chemotypen des DON-Typ und des NIV-Typ lassen sich mit spezifischen Primern auf molekularbiologischer Ebene identifizieren (LEE *et al.* 2001) (siehe 4.3.2).

4.3 Toxinproduktion *in vitro*

Um das Mykotoxinbildungs-Potential eines *Fusarium*-Isolats zu untersuchen werden üblicherweise Fermentationsversuche *in vitro* durchgeführt. Die dabei verwendeten Medien sind je nach Versuchsziel vollsynthetisch (BALDWIN *et al.* 1985), halbsynthetisch oder natürlichen Ursprungs (GANG *et al.* 1998), um unter kontrollierten Bedingungen wenigstens durch Wahl des Substrates den natürlichen Verhältnissen möglichst nahe zu kommen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Menge gebildeter Mykotoxine stark von den Kulturbedingungen abhängt. Hier wären bei festen Substraten wie verschiedenen Getreidearten die Temperatur, der Wassergehalt und die Art des Getreides zu nennen (GREENHALGH *et al.* 1983), wobei in einer Studie von ENGELHARDT *et al.* (1986) auf Reis mehr DON und 3ADON gebildet wurde als auf Mais oder Hafer. Diese Faktoren spielen auch bei der Lagerung von Getreide eine wichtige Rolle (HOMDORK *et al.* 2000). Auch die Gas-Atmosphäre (Partialdruck von O₂ und CO₂) ist von Bedeutung (GREENHALGH *et al.* 1983). Bei Flüssigkulturen kommen weitere Faktoren wie der pH-Wert des Mediums und die Art und Konzentration der Kohlenstoff-Quelle hinzu (UENO *et al.* 1975, MILLER *et al.* 1983a). Auch zeitabhängige Temperaturschwankungen können eine Rolle spielen (RYU UND BULLERMAN 1999), wobei generell eine Zeitabhängigkeit der Mykotoxinbildung besteht (SCHUSTER *et al.* 1987). Der Einfluss all dieser Parameter kann in Abhängigkeit vom verwendeten *Fusarium*-Isolat und untersuchten Mykotoxin mehr oder weniger stark variieren (ENGELHARDT *et al.* 1986).

4.3.1 Verlauf der Trichothecenbildung

Unter Vorgabe einer so großen Variabilität erschien eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Trichothecenbildung unter kontrollierten *in vitro*-Verhältnissen sinnvoll.

Die Versuche mit vier *F. graminearum*-Isolaten wurden auf geschrotetem Reis bei konstanten 28 °C und 40 % Substratfeuchte durchgeführt. Mehrere Arbeiten bestätigen die Temperatur (MILLER *et al.* 1983a) oder auch die anderen Bedingungen als optimal für die Trichothecenbildung von *F. graminearum* (GREENHALGH *et al.* 1983, ENGELHARDT *et al.* 1986). Außerdem liefert der nahezu pigmentfreie geschälte Reis reinere Extrakte als andere Getreide-Arten (GREENHALGH *et al.* 1983).

In 3.3.1 wurde der Verlauf der Trichothecenbildung ausführlich dargestellt. Abb. 3.13 macht deutlich, dass das Maximum der ADON-Bildung mit 12 bis 21 Tagen relativ früh liegt. Zu diesem Zeitpunkt ist der DON-Gehalt (Abb. 3.14) noch relativ niedrig. Eine Zunahme an DON ist zwar auch schon vor dem Maximum von ADON zu verzeichnen, aber wesentlich höhere DON-Gehalte werden erst nach Abnahme des ADON-Gehalts erreicht, was sich auch in dem Quotienten aus ADON- und DON-Gehalt ausdrückt (Abb. 3.15). Dieser Verlauf ist bei den Isolaten 34, 35 und 37 prinzipiell gleich, spielt sich aber auf einem deutlich unterschiedlichen Niveau ab. Isolat 36 bildete über den gesamten Zeitraum nur geringe Mengen an ADON. DON wurde erst ab etwa 21 Tagen in detektierbaren Mengen gebildet, um dann nahezu exponentiell zuzunehmen.

Auch aus der Literatur sind ähnliche zeitliche Verläufe für *Fusarium graminearum* beschrieben. ENGELHARDT *et al.* (1986) beobachteten bei zwei *F. graminearum*-Isolaten sowohl auf Reis als auch auf Mais und Hafer dieses Muster, wenn auch auf unterschiedlichem Niveau. Das Maximum für ADON wurde hier schon nach etwa 10 Tagen erreicht. Das Niveau lag für ein Isolat mit etwa 950 ppm 3ADON im Maximum (Reis) deutlich über den Werten dieser Arbeit (20 - 140 ppm, Abb. 3.13), das andere Isolat befand sich mit etwa 160 ppm im Bereich des stärksten Toxinbildners (Isolat 35). Auch ENGELHARDT *et al.* (1986) beschreiben eine starke Zunahme des DON-Gehalts nach dem Maximum des 3ADON-Gehalts. Die Autoren führen diese Beobachtung auf eine enzymatische Umwandlung von 3ADON zu DON zurück und bezeichnen 3ADON als Vorläufer-Molekül. MILLER *et al.* (1983a) vermuten hier weniger einen biochemischen als vielmehr einen rein chemischen Prozess.

Interessanterweise handelt es sich bei einem der von ENGELHARDT *et al.* (1986) verwendeten *F. graminearum*-Isolate um Isolat 36, allerdings ohne die hier durchgeführte Wirtspassage. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit werden dort aber auf Reis ansehnliche Mengen 3ADON produziert (160 ppm). Aber auch hier findet ein sehr starker Anstieg des DON-Gehalts erst nach etwa 17 Tagen statt. Mögliche Gründe für die Unterschiede im Trichothecen-Level könnten hier in der Inokulum-Größe beider Versuche liegen.

Während bei ENGELHARDT *et al.* (1986) 20 g Reis mit 500 µl einer undefinierten Sporensuspension inokuliert wurden, wurde in der hier vorliegenden Arbeit für 10 g Reis nur 100 µl einer niedrig konzentrierten Suspension (20000 Sporen/ml) verwendet. Ein Einfluss der fehlenden Wirtspassage ist nach den noch zu diskutierenden Ergebnissen aus 3.6 (Abb. 3.31) nicht zu erwarten.

Die drei Isolate 34, 35 und 37 erreichen die Maxima der ADON-Bildung zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierbei könnte es sich einerseits um eine genetisch bedingte Eigenschaft der Isolate handeln. Es könnte aber auch daran liegen, dass die Pilzkulturen das Substrat unterschiedlich schnell besiedelt und durchwachsen haben, die Kulturen also den physiologischen Zustand, mit dem das ADON-Maximum einhergeht, zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht haben. So beobachten MILLER *et al.* (1983a), dass in Flüssigmedium erst nach fast vollständigem Verbrauch der Glucose-Ressourcen ein nennenswerter Anstieg des ADON-Gehalts erfolgt. Also scheint durchaus ein Zusammenhang zwischen dem physiologischen Status einer *Fusarium*-Kultur und der Toxinbildung zu bestehen. Obwohl die Nährstoffe auf festem Medium im Überangebot vorhanden sind, könnten bei vollständiger Bewachung der Oberfläche Engpässe auftreten oder dadurch, dass die Nährstoffe nicht so leicht verfügbar sind wie in Flüssig-Kultur. Generell war der Wechsel der Dominanz von ADON zu DON in den Flüssig-Kulturen nicht so deutlich ausgeprägt wie auf festen Substraten (MILLER *et al.* 1983a, SCHUSTER *et al.* 1987). Andere Faktoren wie der pH-Wert oder die Sauerstoff-Versorgung der teils submersen Kulturen dürften hier eine wichtige Rolle spielen (MILLER *et al.* 1983a).

Als Zeitpunkt für die Probenahme für den Screening-Versuch zur Toxinbildung wurde 21 Tage nach Fermentationsbeginn gewählt. Betrachtet man die Isolate 34, 35 und 37 (Abb. 3.13 und Abb. 3.14), so waren zu diesem Zeitpunkt ausreichende Konzentrationen beider Toxine vorhanden.

4.3.2 Screening-Test der Toxinproduktion und Trichothecen-Chemotypen

Die beobachteten Erträge für die Mykotoxinbildung auf Reis nach 21 Tagen bei 28 °C variierten über alle positiv getesteten Isolate für DON von 0,1 bis 1975 ppm, für ADON von 1,2 bis 1139 ppm, für NIV (nur drei Isolate) von 3,4 bis 17 ppm, für ANIV (auch nur drei Isolate) von 11,5 bis 47,9 ppm und für ZON von 0,69 bis 103 ppm (3.3.2, Abb. 3.16 bis Abb. 3.21).

Auch in der Literatur wird sowohl für *F. graminearum*- als auch *F. culmorum*-Isolate eine hohe quantitative Variabilität im Toxinbildungspotential bescheinigt. Allerdings variiert der

Level der Toxinbildung in den einzelnen Arbeiten beträchtlich, was vermutlich durch verschiedene Substrate, Kulturbedingungen und Kulturdauer oder auch die regionale Herkunft der Isolate verursacht wird. SYDENHAM *et al.* (1991, Südafrika) konnten für *F. graminearum* auf Mais (25 °C, 21 Tage), 5 ppm bis 165 ppm DON nachweisen (9 Isolate) und 3 ppm bis 40 ppm NIV (3 Isolate). Bei SEO *et al.* (1996, Korea) wurden auf Reis (25 °C, 28 Tage) mit 0,1 ppm bis 1940 ppm Werte für DON gefunden, die gut mit denen aus Abb. 3.16 übereinstimmen (26 Isolate). Bei den Isolaten dieser Arbeit traten andererseits sehr starke NIV- und ANIV-Bildung auf (0,1 bis 833 ppm bzw. 0,1 bis 207 ppm). Die Variationsbreite für ZON betrug hier 0,3 bis 1339 ppm. Dieser Wert stimmt von der Größenordnung durchaus mit den Ergebnissen aus Abb. 3.20 überein, wenn die niedrige Wiederfindungsrate für ZON von unter 10 % berücksichtigt wird.

ENGELHARDT *et al.* (1986) haben in ihrer Arbeit die Isolate 40/50 und 32/49 untersucht, die dort die Bezeichnung DSM 4528 bzw. DSM 4527 trugen (siehe Anhang A.6). Auch in dieser Studie ist Isolat 40/50 ein sehr starker Toxinbildner, 32/49 der deutlich schwächere (Abb. 3.21). Allerdings ist die Toxinbildung von 32/49 dort doch deutlich stärker als in Abb. 3.21, wo fast gar keine Mykotoxine auftreten, obwohl in beiden Arbeiten unter nahezu identischen Bedingungen gearbeitet wurde. ENGELHARDT *et al.* (1986) verwendeten jedoch eine undefinierte Inokulum-Menge (s.o.). Die Isolate 40/50 und 32/49 unterscheiden sich jeweils nur in der Bezugsquelle, der Ursprung ist derselbe. Da die Toxinwerte (Abb. 3.21) jeweils recht ähnlich sind, scheint sich auch längere Laborhaltung unter verschiedenen Bedingungen kaum auf das Toxinbildungspotential eines *F. graminearum*-Isolats auszuwirken.

Die Abb. 3.22 macht deutlich, dass offensichtlich eine enge Korrelation zwischen der Bildung von DON und ADON besteht, ZON aber unabhängig davon gebildet wird. Eine enge Korrelation von 3ADON und DON *in vitro* wird von MUTHOMI *et al.* (2000) bestätigt. ZON wird über den Acetat-Malonat-Weg (Polyketid) synthetisiert, die Trichothecene aber als Sesquiterpene über den Acetat Mevalonat-Weg. Alleine schon aus diesem Grund ist eine enge Korrelation zwischen diesen beiden Sekundärmetaboliten nicht unbedingt zu erwarten. Auffällig sind die ADON-Werte einiger Isolate (5, 27, 42, 43), die deutlich höher liegen als die von Isolaten vergleichbarer DON-Bildung (Abb. 3.21). Wie schon für den Verlauf der Trichothecenbildung beschrieben ist es durchaus denkbar, dass sich die Kulturen dieser Isolate in einem anderen physiologischen Zustand befinden. Dies gilt insbesondere für die beiden Misch-Isolate 42 und 43.

Für *F. graminearum* wird in der Literatur eine ausgesprochene Chemotypen-Bildung beschrieben, die auch bei den hier verwendeten Isolaten gut zu beobachten war (Abb. 3.21). Die mit Abstand meisten Isolate gehörten dem DON-Typ an, nur drei der insgesamt 47 *Fusarium*-Isolate dem NIV-Typ, davon nur ein *F. graminearum*-Isolat, das zudem noch eine leichte Verunreinigung mit *F. culmorum* aufwies.

MILLER *et al.* (1991) klassifizieren diese Chemotypen als Chemotyp I (DON-Bildner) und Chemotyp II (NIV-Bildner). Chemotyp I wird hierbei noch in Ia (DON und 3ADON) und Ib (DON und 15ADON) unterteilt, wobei offenbar Typ Ia eher für Europa und Asien typisch ist, Typ Ib eher für Nord- und Südamerika. Auch das Vorkommen der DON- und NIV-Bildner ist weltweit ungleichmäßig verteilt (BOTTALICO UND PERRONE 2002). Der erste klare Beweis dafür, dass diese Chemotypen-Bildung zwischen DON- und NIV-Chemotyp genetisch bedingt ist, konnte durch LEE *et al.* (2002) erbracht werden. Allerdings spricht einiges dafür, dass die Trennung zwischen den Chemotypen nicht immer eine Ja/Nein-Entscheidung ist. So berichten mehrere Arbeitsgruppen von *F. graminearum* Einspor-Isolaten, die sowohl DON als auch NIV bilden können (SUGIURA *et al.* 1990, SEO *et al.* 1996). Außerdem können einige *F. graminearum*-Isolate 3ADON und 15ADON produzieren (MIEDANER *et al.* 2000).

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden bei den DON-Chemotypen regelmäßig kleinere Detektor-Signale mit ähnlicher Retentionszeit wie NIV oder ANIV beobachtet, die allerdings nicht eindeutig als diese Toxine identifiziert werden konnten. Beispielsweise die Isolate 40, 50 und 54 zeigten ein deutliches Signal bei ANIV. Da es sich bei diesen Isolaten auch insgesamt um starke Toxinbildner handelt, wäre denkbar, dass Gene oder Enzyme zur Bildung der NIV-Trichothecene in den DON-Bildnern zwar relativ gesehen auf eine sehr schwache Restaktivität reguliert sind, aber bei insgesamt sehr aktiven Isolaten absolut gesehen doch deutliche Mengen an NIV-Trichothecenen bilden.

Charakteristische Chromatogramme der verschiedenen Chemotypen sind in Abb. 3.23 dargestellt. Besonders interessant sind solche Detektor-Signale, die in allen oder einigen der fermentierten Reisproben, aber nicht im Kontroll-Ansatz auftreten. Bei solchen Peaks handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um weitere Sekundärmetabolite der *Fusarium*-Isolate, eventuell sogar um Mykotoxine. Aus der Literatur sind für *F. graminearum* und *F. culmorum* viele solcher Neben-Metabolite bekannt. Als wichtigste zu erwähnen sind hier Culmorin, die Apotrichothecene, Epiapotrichothecene, Sambucinol, Isotrichodermol, Butenolid und Calonecitrine sowie ggf. deren jeweilige oxygenierte Derivate (GREENHALGH *et al.* 1986, PINEIRO *et al.* 1996, MILLER UND MACKENZIE 2000, LANGSETH *et al.* 2000). Darüber hinaus können

noch B-Typ- Tricothecene auftreten, die in ihrer Substitution von den üblichen abweichen, beispielsweise 3,15-Diacetyl-DON oder 4,7-Dideoxynivalenol (PINEIRO *et al.* 1996).

4.4 Aggressivitätstest und Korrelation zur Toxinproduktion *in vitro*

In einem Test an jungen Weizenpflanzen wurde die Aggressivität der auf ihr Toxinbildungs-Vermögen getesteten *Fusarium*-Isolate untersucht, der wie unter 2.6 beschrieben mit einer künstlichen Verletzung an der Sprossbasis von sieben Tage alten Keimlingen durchgeführt wurde. Die Bonitur der Symptome erfolgte dann nach sieben Tagen. Nur wenige *Fusarium*-Isolate fallen durch besonders hohe oder geringe Aggressivität auf (Abb. 3.26 - Abb. 3.28). Die Bonitur-Parameter Verbräunungslänge und Stängelumfassung zeigen eine sehr enge Korrelation (Abb. 3.29). Dies zeigt, dass sich das Myzel nach Inokulation der Sprossbasis bei allen Isolaten sehr ähnlich ausbreitet, was das Verhältnis zwischen vertikalem und horizontalem Wachstum betrifft. Anscheinend ist die Aggressivität von *F. graminearum* an der Sprossbasis nicht gewebespezifisch. Dies deckt sich mit Aussagen von MIEDANER *et al.* (1997), nach denen die Aggressivität von *F. culmorum* nahezu unabhängig von Infektionsstadium, infiziertem Organ oder Umwelt ist.

In der Literatur wurden häufig Biotests im Zusammenhang mit der Aggressivität von *Fusarium* durchgeführt, deren Nähe zu den *in vivo*-Verhältnissen des komplexen Wirt/Parasit-Systems stark variieren. In einigen Tests wird mit den Mykotoxinen alleine gearbeitet, wobei es sich dann um klassische Phytotoxizitätstests handelt. VURRO UND ELLIS (1997) testen die Wirkung von ANIV auf Zellkulturen der Pappel, BRUINS *et al.* (1993) untersuchen, wie sich DON auf Kallus-Gewebe, Koleoptilen-Abschnitte oder Keimlinge von Weizen auswirkt. Solche Tests dienen meist der Suche nach einfachen Testverfahren für die Selektion resistenter Getreide-Genotypen in der Pflanzenzüchtung. Aggressivitätstests im eigentlichen Sinne bedienen sich beispielsweise der Kulturfiltrate von *Fusarium*-Isolaten verschiedener Toxinbildung, so dass hier nicht nur bestimmte Metabolite, sondern das gesamte Spektrum gebildeter Sekundärstoffwechselprodukte mit in den Test einfließen kann (LANGSETH *et al.* 1997).

In einem Biotest, bei dem abgeschnittene Primärblätter von Weizen mit einem Tropfen Sporensuspension verschiedener *F. culmorum*-Isolate inkubiert wurden, konnte kein Zusammenhang zwischen der Aggressivität der verwendeten Isolate in diesem Test und ihrer Toxinbildung *in vitro* hergestellt werden (MUTHOMI *et al.* 2000). Andere Autoren arbeiten zu Lasten der Einfachheit, aber zugunsten der Natürlichkeit des Systems nicht nur mit den zu untersu-

chenden Pathogenen sondern auch mit intakten jungen Getreidepflanzen. MIEDANER UND SCHILLING (1996) beschreiben einen Test, bei dem das Inokulum als Sporensuspension in den oberen Bereich des Substrates (Vermiculit) von Pflanztöpfen eingearbeitet wird. Bei MANKA *et al.* (1985) produzierten die an jungen Weizen-Pflanzen aggressiveren Isolate von *F. culmorum* und *F. graminearum* *in vitro* auch beträchtliche Mengen an ZON, DON und 3ADON. Einige Isolate waren aber hoch aggressiv und bildeten kein oder nur sehr wenig DON, 3ADON oder ZON. Die Körner wurden hierbei in Töpfen ausgesät, in denen mit *F. culmorum* bewachsene Agarscheiben lagen. LOGRIECO *et al.* (1990) konnten unter Verwendung derselben Methode (CHELKOWSKI UND MANKA 1983) und unter Berücksichtigung der Bildung von ZON, DON, 3ADON, 15ADON, NIV und ANIV für 9 untersuchte *F. graminearum*-Isolate keine klaren Zusammenhänge zwischen Aggressivität und Toxinbildung *in vitro* zeigen.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte zwischen der Toxinbildung *in vitro* und der Aggressivität der *Fusarium*-Isolate kein Zusammenhang hergestellt werden (3.5, Tab. 3.11, Abb. 3.30). Hierfür gibt es mehrere mögliche Ursachen.

Die erste Möglichkeit ist, dass tatsächlich nicht einmal ein geringer Zusammenhang zwischen Aggressivität und Toxinbildung besteht. Dies stünde aber im Gegensatz zu vielen aus der Literatur bekannten Ergebnissen (HARRIS *et al.* 1999, MESTERHAZY 2002), so dass auch andere mögliche Ursachen zumindest in Betracht zu ziehen sind.

Eine solche zweite Erklärung wäre, dass die *Fusarium*-Isolate sicher nicht nur DON, ADON, NIV, ANIV und ZON als toxische Metabolite bilden. Wie schon unter 4.3 erläutert, ist das Spektrum an potentiellen Aggressivitätsfaktoren groß (GREENHALGH *et al.* 1986, PINEIRO *et al.* 1996, MILLER UND MACKENZIE 2000, LANGSETH *et al.* 2000) und für viele von ihnen, beispielsweise Butenolid, Culmorin oder Dihydroxycalonectrin, wurde die Phytotoxizität nachgewiesen (WANG UND MILLER 1988). Weiterhin ist bekannt, dass verschiedene gemeinsam auftretende Mykotoxine Wechselwirkungen zeigen können (TAJIMA *et al.* 2002) und nicht nur additive, sondern auch synergistische phytotoxische Effekte besitzen können (MCLEAN 1996a). Dieses Argument wird allerdings dadurch etwas geschwächt, dass auch in anderen Arbeiten (mit *F. culmorum*), die nur DON in die Untersuchung einbeziehen, ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Aggressivität und DON-Bildung nachzuweisen ist (HESTBJERG *et al.* 2002).

Eine dritte Möglichkeit ist, dass entweder der Aggressivitätstest den Verhältnissen im natürlichen Pathosystem nicht nahe genug kommt oder die Toxinbildung *in vitro* nicht den *in vivo*-Verhältnissen entspricht bzw. eine Kombination aus beiden Problemen vorliegt. In diesem

Aggressivitätstest (2.6) werden im Vergleich zu vielen anderen Systemen (z.B. MUTHOMI *et al.* 2000) vollständige und intakte Pflanzen des natürlichen Wirtes verwendet. Auch die Art der Inokulation mittels künstlicher Verwundung durch einen in Sporensuspension getauchten Zahnstocher erscheint durchaus angemessen, da Vorversuche zeigten, dass eine Inokulation intakten Blattgewebes praktisch nicht möglich ist. Außerdem war der potentielle Aggressivitätsfaktor, dem hier das Hauptinteresse galt, schließlich die Toxinbildung und nicht die Aktivität von Cutinasen oder von pektinolytischen Enzymen, die am Eindringen des Pathogens in den Wirt beteiligt sein könnten (PRITSCH *et al.* 2000, KANG UND BUCHENAUER 2002, WANYOIKE *et al.* 2002) und deren Einfluss eine künstliche Verwundung verschleiern würde. Die mögliche Funktion von DON als Aggressivitätsfaktor scheint vielmehr darin zu bestehen, das Gewebe des Wirtes durch die phytotoxische Wirkung für eine Besiedlung des Pathogens vorzubereiten (SNIJDERS UND KRECHTING 1992). Eine Verlagerung von DON oder 3ADON in noch nicht von *F. culmorum* besiedeltes Gewebe konnten auch KANG UND BUCHENAUER (1999) zeigen. Auf eine große Bedeutung von DON für die Ausbreitung im Wirt weisen auch die Ergebnisse von BAI *et al.* (2001) hin. Eine transgene Defektmutante von *F. graminearum* kann Weizenähren zwar noch infizieren, breitet sich von einem infizierten Ährchen aber nicht mehr zum benachbarten Ährchen aus. Auch die Beobachtung, dass durch ANIV - wenn auch an einer Pappel-Zellkultur - die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase gehemmt wird, einem Enzym, das durch seine Schlüsselfunktion im Phenylpropan-Stoffwechsel eine wichtige Rolle in den Abwehrreaktionen der Pflanze spielt, spricht dafür, dass die Trichothecene die Ausbreitung im Wirt entscheidend mit bestimmen (VURRO UND ELLIS 1997).

Einen weiteren Hinweis darauf, dass DON eher an der Kolonisation des Wirtsgewebes als an den ersten Schritten der Pathogenese beteiligt ist, liefern die Ergebnisse aus Abb. 3.26 bis 3.28 und Tab. 3.11. Schon im Ergebnisteil wurde auf das Problem der Nullwerte im Aggressivitätstest im Zusammenhang mit der Befallshäufigkeit hingewiesen (3.4 und 3.5). Diese Nullwerte repräsentieren Pflanzen, bei denen die Inokulation nicht erfolgreich war. Ein Maß dafür ist die Befallshäufigkeit (Abb. 3.17), bei der auch zwischen den Isolaten deutliche Unterschiede auftreten. Die Darstellung der Ergebnisse ohne Nullwerte scheint daher die bessere Art zu sein, da bei einer Darstellung der Ergebnisse mit Nullwerten verschiedene Informationen vermischt werden, und zwar die Fähigkeit eines Isolats, sich generell auf dem Wirt zu etablieren (erfolgreiche Inokulation) und andererseits die Fähigkeit, sich im Wirt auszubreiten. Wenn nun der Einfluss von DON für diese zweite Fähigkeit von Bedeutung ist, dann müsste die Korrelation zwischen DON und den Befallsparametern ohne Nullwerte (Nr. 9 und

10 in Tab. 3.11) höher sein als zu den Parametern mit Nullwerten (Nr. 6, 7 in Tab. 3.11) oder gar der Befallshäufigkeit (Nr. 8 in Tab. 3.11). Dies ist zumindest tendenziell der Fall.

Offenbar können Faktoren also auch nur für bestimmte Phasen der Pathogenese einen Einfluss auf die Aggressivität haben. Eine Unterteilung in Aggressivität Typ I (erste Besiedlung) und Typ II (Ausbreitung im Wirt) mit ihren jeweiligen Aggressivitätsfaktoren analog zu den verschiedenen Resistenztypen (SCHROEDER UND CHRISTENSEN 1963) gegen Ähren-Fusariosen wäre daher zu erwägen. Dennoch konnte keine gute Übereinstimmung zwischen der Aggressivität der Isolate 34, 35, 36 und 37 im Aggressivitätstest und in der Ähren-Inokulation gefunden werden, wie ein Vergleich der Abb. 3.32 und 3.44 zeigt. Isolat 36 besitzt zwar in beiden Systemen die schwächste Aggressivität, aber das in der Ähren-Inokulation sehr stark aggressive Isolat 37 ist im Aggressivitätstest das zweitschwächste. SIDOROV *et al.* (1998) führen ins Feld, dass eine Inokulation mit Konidien oder Ascosporen von *F. graminearum* an Weizen-Ähren zwar dieselbe Symptomausprägung hervorruft (bestätigt durch STACK 1989), aber die DON-Akkumulation im Falle einer Inokulation mit Ascosporen deutlich höher ist. Doch auch dies kann die niedrige Korrelation zwischen Aggressivität und Toxinbildung *in vitro* nicht erklären, da erstens nur die Symptome und nicht der DON-Gehalt als Parameter für die Aggressivität herangezogen wurden und zweitens nur bei zwei Isolaten Ascosporen im Inokulum beobachtet wurden (Isolate 1 und 17).

Die Informationen zur Übertragbarkeit der Toxinbildung *in vitro* auf die *in vivo*-Bedingungen sind nicht ganz eindeutig. Während sich die meisten Autoren einig sind, dass eine qualitative Übertragbarkeit gegeben ist (ATANASSOV *et al.* 1994, GANG *et al.* 1998), sind die Meinungen in Hinblick auf die Toxinbildungs-Quantität nicht ganz so eindeutig. Bei ATANASSOV *et al.* (1994) ist bei verschiedenen *Fusarium*-Arten ein quantitativer Zusammenhang zwischen Toxinbildung *in vitro* und *in vivo* nicht für alle Isolate gegeben. MUTHOMI *et al.* konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge der DON- bzw. NIV-Produktion für *F. culmorum*-Isolate *in vitro* und *in vivo* feststellen (2000), nicht aber für *F. graminearum*-Isolate in einer folgenden Arbeit (2002a). Außerdem wurde hier die acetylierte Form von DON (15ADON) nur *in vitro* detektiert. Das könnte aber daran liegen, dass die *in vivo*-Proben erst zur Ernte untersucht wurden. Wenn ADON jedoch wie oben ausführlich diskutiert (4.3) nur in frühen Stadien der Kultur gebildet wird, dann könnte in den Körnern schon alles 15ADON zu DON umgewandelt worden sein. Auch bei GANG *et al.* (1998) trat kein qualitativer Zusammenhang zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Toxinproduktion auf. Ein Grund für diese offenbar in den meisten Fällen fehlende Korrelation könnte sein, dass *in vivo* - sei es im

Keimlingstest oder im Feld auf der Ähre - stets noch andere eventuell antagonistische, in jedem Fall aber konkurrierende Mikroorganismen vorkommen. Einen Einfluss antagonistischer Organismen auf die Trichothecenproduktion von *F. graminearum* konnten COONEY *et al.* (2001) belegen.

Ein Vergleich der Abb. 3.31 und 3.46 bringt für die Isolate 34, 35, 36 und 37 auch kein klares Ergebnis, was den Zusammenhang zwischen der DON-Produktion *in vitro* und *in vivo* betrifft. Isolat 36 bildete zwar in beiden Fällen am wenigsten DON, aber während die DON-Mengen der drei übrigen Isolate 34, 35 und 37 *in vitro* starke Unterschiede aufwiesen, lagen die DON-Werte in den Versuchen zur Ähren-Inokulation relativ dicht beieinander. Signifikante Unterschiede traten zwischen diesen Isolaten zu keinem Zeitpunkt auf. Lediglich schien Isolat 34 auch *in vivo* von diesen drei Isolaten der schwächste DON-Bildner zu sein.

Es ist also wahrscheinlich, dass der Grund für die fehlende Korrelation zwischen Ergebnissen zur Toxinbildung *in vitro* und denen des Aggressivitätstests auf der mangelnden Übertragbarkeit der *in vitro*- auf die *in vivo*-Verhältnisse beruht. Vergleichbare Beobachtungen machen GILBERT *et al.* (2001). Wünschenswert wäre ein Test, in dem - ähnlich wie in den Ähren-Inokulationen - für eine große Zahl von *Fusarium*-Isolaten die Aggressivität und die Toxinproduktion parallel gemessen werden.

Wegweisend ist in dieser Hinsicht die Arbeit von HESTBJERG *et al.* (2002). Dort wurden Gersten-Körner mit einer Sporen-Suspension verschiedener *F. culmorum*-Isolate inokuliert und nach sieben Tagen die Symptome bonitiert und der DON-Gehalt genau dieser Proben gemessen. Für die 15 Isolate ergab sich eine deutliche signifikante Korrelation zwischen DON-Gehalt und Aggressivität. Zwei Ausreißer-Isolate wurden später als NIV-Bildner identifiziert.

4.5 Einfluss einer Wirtspassage auf Toxinproduktion und Aggressivität

Mit den vier Isolaten 30, 31, 32 und 33 wurde zu Beginn der Versuche eine Wirtspassage durchgeführt. Eine Wirtspassage dient im allgemeinen der Wiederherstellung der natürlichen Aggressivität eines Krankheitserregers, der lange unter Laborbedingungen gehalten wurde und dadurch an Aggressivität eingebüßt haben könnte. Obwohl dieses Verfahren weit verbreitet ist, wurde dieses in der phytopathologischen Literatur nur spärlich dokumentiert (AWUAH UND LORBEER 1988, BEDI 1994). Da diese vier Isolate zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden (siehe Anhang A.6), aber viele gemeinsame Versuche mit ihnen durchgeführt werden sollten, erschien eine solche Maßnahme sinnvoll, um einen gemeinsamen Ausgangszustand

zu regenerieren. Tatsächlich konnte die Aggressivität aller vier Isolate durch die Wirtspassage teilweise signifikant erhöht werden (Abb. 3.32). Die Toxinbildung zeigte nach der Wirtspassage teils auch signifikante Unterschiede, aber ein gemeinsamer Trend ließ sich weder für DON, ADON noch ZON erkennen (Abb. 3.31).

In der Literatur werden Vertreter der Gattung *Fusarium* als sehr variabel beschrieben (SCHNEIDER 1958, KALE UND BENNETT 1992). SCHNEIDER (1958) beschreibt schon zur damaligen Zeit lange bekannte Kultur-Varianten von *Fusarium* (hier *F. avenaceum*), deren Auftreten im Labor zwar regelmäßig beobachtet wird, für das aber bis heute keine befriedigende Erklärung gefunden ist. Solche Entwicklungen sollen beispielsweise durch bestimmte Licht-Verhältnisse gefördert werden (AWUAH UND LORBEER 1989), durch häufige Subkultur auf nährstoffreichen Medien (BURGESS *et al.* 1994) und durch Subkultur durch Massentransfer des Myzels. Die Kultur-Varianten weichen sowohl morphologisch als auch physiologisch vom Wildtyp ab und werden meist als degenerierte Formen verstanden (BURGESS *et al.* 1994). SCHNEIDER (1958) und BURGESS *et al.* (1994) unterscheiden zwischen dem Pionnotes-Typ und dem Luftmyzel-Typ. Beide Typen zeigen ein verlangsamtes Wachstum. Der Pionnotes-Typ wächst sehr flach und bildet kein Luftmyzel, während der Luftmyzeltyp meist farbloses Luftmyzel zeigt (BURGESS *et al.* 1994). Beide Typen bilden reichlich Konidien in Sporodochien (SCHNEIDER 1958). O'DONNELL *et al.* (1998) berichten für *F. venenatum* auch von degenerierten Varianten, die keine Konidien bildeten. LIN *et al.* (1988) bezeichnen für *F. oxysporum* f.sp. *pisi* den Pionnotes-Typ als die irreversible Endphase einer degenerativen Entwicklung. Die Aggressivität degenerierter Stämme soll laut Literatur reduziert sein oder ganz fehlen, was für *F. avenaceum* (SCHNEIDER *et al.* 1958), *F. oxysporum* f.sp. *apii* (AWUAH UND LORBEER 1988) und f.sp. *pisi* (LIN *et al.* 1988) und *Fusarium* allgemein (BURGESS *et al.* 1994) beschrieben wurde. OSWALD (1949) konnte dies für *F. graminearum* und andere *Fusarium*-Arten an Weizenkeimlingen feststellen. Hinsichtlich der Trichothecenbildung werden für *F. compactum* und *F. acuminatum* subssp. *armeniaceum* keine Unterschiede zum Wildtyp beschrieben, wohl aber eine reduzierte ZON-Bildung von *F. graminearum* bei mutagen erzeugten Varianten (DUNCAN UND BU'LOCK 1985). Beide Kultur-Varianten von *F. oxysporum* f.sp. *apii* konnten durch eine Wirtspassage nicht wieder zum Wildtyp regeneriert werden (AWUAH UND LORBEER 1988).

Unklar bei dieser Fülle von teils widersprüchlichen Informationen ist allerdings, inwieweit sich dies Konzept von möglicherweise degenerierten Kultur-Varianten uneingeschränkt auf *F. graminearum* als Weizen-Pathogen übertragen lässt. Dennoch wurde im Aggressivitätstest

sicherheitshalber dafür Sorge getragen, dass spontan auftretende anormal pigmentierte Kulturen mit Ähnlichkeit zum Pionnotes-Typ wenn möglich verworfen wurden, oder aber innerhalb eines Versuches von allen Isolaten ein gleicher Anteil solcher Kulturen verwendet wurde. Bei den Subkulturen wurde darauf geachtet, dass nährstoffreiche Medien wo immer möglich vermieden wurden, um die Chance für die Bildung von Kultur-Varianten zu minimieren. Dennoch traten auch nach der Wirtspassage bei den in den Ähren-Inokulationen untersuchten Isolaten vor allem bei Isolat 34 und 35 Kultur-Varianten auf, bei denen eine Ähnlichkeit zum Pionnotes-Typ nicht ausgeschlossen werden konnte. Isolat 36 wiederum zeigte nur geringe Sporulation. Trotz der Wirtspassage ist ein altersbedingter Fitnessverlust bei diesem Isolat nicht gänzlich auszuschließen. Bei allen vier Isolaten war aber eine deutliche Aggressivität vorhanden, die wie oben beschrieben durch die Wirtspassage sogar noch gesteigert werden konnte.

4.6 Ähren-Inokulationen

In den Ähren-Inokulationen wurde unter kontrollierten Bedingungen mit den *F. graminearum*-Isolaten 34, 35, 36 und 37 gearbeitet. Da der Einfluss von Umweltfaktoren bei den Ährenfusariosen nicht zu unterschätzen ist, konnten auf diese Weise alle Versuche unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden und so der Einfluss der gewollt variierten Faktoren untersucht werden. Außerdem konnte eine Überlagerung der künstlichen Inokulation durch eine natürliche *Fusarium*-Infektion vermieden werden und fortlaufende Versuche unabhängig von der Vegetationsperiode waren möglich. Die Ährenversuche 1 bis 3 werden im folgenden gemeinsam diskutiert.

4.6.1 Verlauf des Befalls und des DON-Gehalts

Vier der interessantesten Aspekte sollen an dieser Stelle hervorgehoben werden. Erstens der früheste Zeitpunkt erkennbarer Symptome und detektierbarer DON-Mengen, zweitens die Unterschiede zwischen den Isolaten, drittens die Entwicklung des DON-Gehalts am Ende der Vegetation und viertens wird auf die Auswirkung einer *F. graminearum*-Inokulation auf Ernte-Parameter eingegangen.

Die ersten Symptome konnten drei Tage (Versuch 3) bzw. vier Tage (Versuch 1 und 2) nach Inokulation bei allen Isolaten festgestellt werden (Abb. 3.34, 3.38, 3.44). Meist traten diese Symptome in Form relativ leicht verbräunter Spelzenränder oder aber schon als die charakte-

ristischen meist relativ scharf begrenzten Verbräunungen mitten auf den Spelzen auf. Besonders dann, wenn die Symptome den zuerst beschriebenen Charakter hatten, war die Bonitur solcher schwacher oder beginnender Symptome ein kritischer Punkt, da oft nur schwer entschieden werden konnte, ab wann eine minimale Verbräunung als Symptom zu werten war. Der früheste Zeitpunkt, zu dem geringe Mengen DON nachgewiesen werden konnten, war ebenfalls drei Tage nach Inokulation in Versuch 3. Leider war dieser Probetermin durch den Verlust mehrerer Proben nicht auswertbar, aber Einzelwerte für alle vier Isolate zeigten einen DON-Gehalt von etwa 10 ppm. In den anderen Versuchen erfolgte die erste Beprobung der Ähren erst nach sieben Tagen, so dass hier ein ähnlich frühes Auftreten von DON versuchsbedingt nicht nachgewiesen werden konnte, aber aufgrund der ähnlich frühen Symptomausprägung nach vier Tagen durchaus zu erwarten ist.

Sowohl für das erste Auftreten von Symptomen als auch die erste Nachweisbarkeit von DON sind aus der Literatur ähnliche Werte bekannt. Konidien von *F. graminearum* oder *F. culmorum* keimen nach 6-12 Stunden auf der Oberfläche der Weizenährchen (PRITSCH *et al.* 2000, KANG UND BUCHENAUER 2002) und verzweigen sich reichlich, ehe sie nach etwa 36 Stunden die Epidermis penetrieren (*F. culmorum*, KANG UND BUCHENAUER 1999). *F. graminearum* bildet 24 bis 36 Stunden nach Inokulation Infektionshypen (WANYOIKE *et al.* 2002). Auch von einem subcuticulären Wachstum von *F. graminearum* während dieser frühen Phase und einem Eindringen über die Stomata nach 48 Stunden bis 72 Stunden wird berichtet (PRITSCH *et al.* 2000). Ein solches subcuticuläres Wachstum könnte das auf der Oberfläche sonst eher ungeschützte Myzel vor Austrocknung schützen. Nach 36 Stunden konnten KANG UND BUCHENAUER (1999) DON und 3ADON in Parenchymzellen des Wirts und noch deutlicher in Epidermiszellen feststellen, vor allem in der Epidermis-Zellwand in direkter Nähe der Penetrationshyphe (Immunogold-Markierung). EVANS *et al.* (2000) stellten die Anwesenheit von DON und 15ADON bei einer *F. graminearum*-Inokulation von Gerste ebenfalls nach 36 Stunden bis 48 Stunden fest, MIROCHA *et al.* (1997) bei Weizen nach 48 Stunden. Der bisher früheste Nachweis von DON in planta gelang CHEN *et al.* (1996) in verschiedenen Weizensorten 24 Stunden nach einer Inokulation mit *F. graminearum*. Nach zwei Tagen beobachteten KANG UND BUCHENAUER (1999) erstes interzelluläres Wachstum von *F. culmorum* und in benachbarten Wirtszellen war DON und ADON zu detektieren. Zu diesem Zeitpunkt konnten PRITSCH *et al.* (2000) bei *F. graminearum* bereits intrazelluläre Besiedlung der Epidermis und des Parenchyms feststellen. Nach drei Tagen werden die ersten makroskopischen Symptome (Verbräunungen) sichtbar und auch KANG UND BUCHENAUER (1999) können intrazelluläres Wachstum nachweisen. Von den künstlich inokulierten Ährchen ausgehend erreicht das My-

zel von *F. culmorum* nach vier bis sechs Tagen die Ährenspindel (KANG UND BUCHENAUER 1999) und besiedelt das Leitgewebe (Xylem und Phloem). Nach 10 Tagen konnte auch in unbesiedeltem Leitgewebe 3 Spindelstufen ober- und unterhalb der Infektionsstelle DON und 3ADON im Phloem und Xylem (nur oberhalb) festgestellt werden. Auch die jungen Körner oberhalb der Infektionsstelle enthielten wenig Mykotoxine. Eine solche Verlagerung des Mykotoxins wurde auch von SNIJDERS UND KRECHTING (1992) vermutet. MIROCHA *et al.* (1997) konnten dies nicht nachweisen.

SAVARD *et al.* (2000) stellen fest, dass DON nach einer Einzelährchen-Inokulation an Weizen mit *F. graminearum* deutlich stärker akropetal als basipetal verlagert wird. Das spricht dafür, dass die Verlagerung hauptsächlich über Massentransport mit dem Xylemstrom erfolgt. Weiterhin war der DON-Gehalt der Spindel und der Spelzen in dieser Arbeit mit 1000 ppm bis 1200 ppm etwa doppelt so hoch wie der der Körner. Diese Beobachtung deckt sich relativ gesehen gut mit den Ergebnissen aus Abb. 3.53, in der die Maximalwerte für die Körner etwa 140 ppm betragen, für die Spindel und die Spelzen etwa 270 ppm. Andere Arbeitsgruppen beobachten ebenfalls deutliche Unterschiede im DON-Gehalt einzelner Ährenpartien. SNIJDERS UND KRECHTING (1992) stellten fest, dass der DON-Gehalt der Spelzen nur geringfügig höher war als der der Körner, dass aber die Besiedlung der Körner deutlich niedriger war. Daher vermuten sie die Verlagerung von DON ins Korn. Auch bei MILLER *et al.* (1985) enthalten die Spelzen deutlich mehr DON als die Körner. Die Spelzen verschiedener Weizensorten enthielten im Durchschnitt 9,5mal mehr DON. Deutlich mehr DON in der Spindel als in den Spelzen oder gar in den Körnern konnten SINHA UND SAVARD (1997) nachweisen. Interessanterweise ist auch beim Mais mehr DON in den vegetativen Teilen des Blütenstandes (Zapfen) enthalten als in den Körnern (REID *et al.* 1996. Möglicherweise ist das Korn gegen die passive Verlagerung von DON dadurch geschützt, dass es durch seine geschützte Lage im Gegensatz zu den Spelzen oder der Spindel wenig transpiriert und so nur ein vergleichsweise geringer Xylemstrom ins Korn fließt.

Möglicherweise ist eine Einzelährchen-Inokulation verglichen mit einer Sprüh-Inokulation tatsächlich die günstigere Methode, wenn die Rolle von DON für verschiedene *Fusarium*-Isolate untersucht werden soll, da DON anscheinend eine wichtige Rolle für die Ausbreitung im Wirt spielt, die durch eine Inokulation der gesamten Ähre aber in gewissem Sinne schon künstlich vorweggenommen wird. Gegen eine solche Methode könnte allerdings die schlechte Kontrollierbarkeit der Sporenanzahl bei der relativ kleinen injizierten Inokulum-Menge von 10 µl sprechen (KANG UND BUCHENAUER 1999, EVANS *et al.* 2000, SAVARD *et al.* 2000), da

es bei einer Sporensuspension auch bei größeren Volumina nicht immer gelingt, eine homogene Suspension zu erhalten. Größere Volumina allerdings könnten von dem kleinen Hohlraum zwischen den Spelzen nicht mehr aufgenommen werden.

Zwischen den vier getesteten *F. graminearum*-Isolaten konnten deutliche signifikante Unterschiede festgestellt werden. Dies gilt sowohl für den Befall als auch für den DON-Gehalt. Dies belegt die unterschiedliche Aggressivität der Isolate und wegen der signifikanten Korrelationen zwischen diesen beiden Parametern auch die Möglichkeit, DON als Aggressivitätsfaktor zu betrachten (z.B. Tab. 3.25). Diese Unterschiede waren für die Befallshäufigkeit in frühen und mittleren Stadien der Pathogenese am deutlichsten (etwa 5 dpi bis 35 dpi, Abb. 3.38 und 3.44). Gegen Ende der Vegetationsperiode wurden diese Unterschiede wieder undeutlicher. Beim DON-Gehalt traten die signifikanten Unterschiede vor allem im mittleren Teil der Pathogenese auf, und zwar je nach Versuch im Bereich von 14 dpi bis 49 dpi (Abb. 3.41 und 3.46). Wahrscheinlich hat das Wirt/Parasit-System in diesem Zeitraum unter den gegebenen Bedingungen die höchste Stabilität. Dazu beitragen könnte, dass nach etwa drei bis vier Wochen in allen drei Versuchen der größte Teil des DON schon gebildet ist, das später zur Ernte auch in der Ähre vorliegen wird (Abb. 3.36, 3.41, 3.46). Der Verlauf des Wassergehalts zeigte in allen Versuchen einen charakteristischen Verlauf, bei dem die inokulierten Ähren einen schnelleren Wasserverlust zeigten als die Kontroll-Ähren (Abb. 3.35, 3.40), was durch die Nekrotisierung und/oder Notreife einzelner Ährenabschnitte bedingt sein dürfte. Ein ganz ähnliches Bild findet sich bei MILLER UND YOUNG (1985).

Aus der Literatur sind bisher nur wenige Arbeiten bekannt, in denen mehrere verschiedene *F. graminearum*-Isolate über die gesamte Pathogenese kontinuierlich hinsichtlich Befall und DON-Bildung untersucht werden. In diesen Studien werden zudem in aller Regel nur Trichothecen-defiziente Transformanten mit dem Wildtyp verglichen. Von EUDES *et al.* (2001) wurde ein nicht Trichothecen bildendes *F. graminearum*-Isolat und der Trichothecen bildende Wildtyp untersucht. Bei 18 Sommerweizensorten entwickelte das transformierte Isolat über die ersten drei Wochen bestenfalls sehr schwache Symptome, der Wildtyp deutlich stärkere. Die Symptome des Transformanten waren relativ zum Wildtyp gesehen deutlich schwächer als die des schwachen DON-Bildners (Isolat 36) im Vergleich zu den übrigen Isolaten (Abb. 3.38 oder 3.44). BAI *et al.* (2001) bestätigen, dass bei einer Inokulation der gesamten Ähre auch ein nicht Trichothecen bildendes Isolat von *F. graminearum* mit einer gewissen Verzögerung dasselbe Befallsniveau erreicht wie der Wildtyp (bzw. schwacher DON-Bildner Isolat 36 in Abb. 3.38 und 3.44). Auch die Ergebnisse dieser Arbeiten sprechen für eine Bedeutung

von DON als Aggressivitätsfaktor. Eine zeitliche Studie mehrerer *F. graminearum*-Isolate unterschiedlicher Aggressivität an Weizen wurde m. E. bisher nicht durchgeführt.

Charakteristisch für den Verlauf des DON-Gehalts war ein starker Anstieg zu Beginn der Infektion, vor allem bei aggressiveren Isolaten wie Isolat 37 (Abb. 3.36 und 3.46), was sich gut mit dem Ergebnis von MILLER UND YOUNG (1985) deckt. Die in der Literatur des öfteren dokumentierte Abnahme des DON-Gehalts zum Ende der Vegetation vor der Ernte konnte in der vorliegenden Arbeit statistisch nicht abgesichert werden. Von diesem Phänomen berichten SCOTT *et al.* (1984) bei einer natürlichen Infektion von Winterweizen oder Gerste (PROM *et al.* 1999) mit *Fusarium* (Ährenbefall) und MILLER *et al.* (1983b) und MILLER UND YOUNG (1985) bei einer künstlichen Inokulation von Mais bzw. Weizen mit *F. graminearum*. Eine denkbare Ursache für eine solche Entwicklung wäre ein Verdünnungseffekt, der dadurch eintritt, dass die Kornmasse noch zunimmt, aber kein DON mehr gebildet wird. Außerdem ist ein begrenzter chemischer Abbau oder ein Abbau durch Mikroorganismen (Hefen, Bakterien) nicht auszuschließen. In der Literatur werden eine Hemmung der DON-Bildung oder ein enzymatischer Abbau von DON durch den Wirt als mögliche Resistenzmechanismen erwogen (MILLER *et al.* 1983b), was im Zusammenhang mit Ährenversuch 4 weiter unten diskutiert werden soll.

Bedingt durch die Inokulation veränderten sich die untersuchten Ertragsparameter (3.7.7.1) fast entsprechend der Aggressivität der einzelnen *F. graminearum*-Isolate. Das Isolat mit der schwächsten Aggressivität und der niedrigsten DON-Bildung war den Ergebnissen der nicht inokulierten Kontrolle am ähnlichsten. Diese Auswertung auf Ertragsebene wurde zwar nur für Versuch 3 durchgeführt, lässt sich aber durch einen Vergleich mit den Ergebnissen aus der Literatur gut absichern (PERKOWSKI 1998, ARSENIUK *et al.* 1999). Ein Befall mit *F. graminearum* wirkt sich auf die Kornmasse pro Ähre und auf die Tausendkornmasse (MUTHOMI *et al.* 2000) aus, nicht aber auf die Kornzahl pro Ähre (Tab. 3.28). Letzteres lässt sich dadurch erklären, dass die Ausbildung der Kornanlagen schon zu einem Zeitpunkt vor der Inokulation abgeschlossen war und eine Infektion mit *F. graminearum* offenbar nur noch über die Kornfüllung und die Kornausbildung Einfluss auf den Ertrag nehmen kann. So treten im Anteil tatsächlich ausgebildeter Körner zwischen den Isolaten verschiedener Aggressivität durchaus signifikante Unterschiede auf (Tab. 3.29), ebenso wie im Befallsgrad der Körner (Abb. 3.50). Auch MAIER UND OETTLER (1996) beschreiben einen Einfluss eines *F. graminearum*-Befalls auf die Parameter Kornmasse / Ähre, Kornzahl / Ähre und Tausendkornmasse, MESTERHAZY (2002) einen Einfluss der Isolate auf den Anteil befallener Körner. Die Korngrößenverteilung

wird ebenfalls verändert (PERKOWSKI 1998) und zwar wird die Verteilung verschoben zu kleineren Körnern, je aggressiver ein Isolat ist (Abb. 3.52).

Eine Untersuchung des DON-Gehalts in Abhängigkeit von der Korngröße oder dem Befallsgrad der Körner konnte in der vorliegenden Arbeit wegen des geringen Probenumfangs nicht durchgeführt werden, ist aber für folgende Versuche durchaus wünschenswert. Die Ergebnisse anderer Gruppen in diesem Zusammenhang zeigen, dass die stärker befallenen Körner (SINHA UND SAVARD 1997, weißes und rosa Kümmerkorn, Weizen) und die kleineren Körner (PERKOWSKI 1998, < 2 mm, Gerste) die höchsten DON-Gehalte aufweisen. Dies könnte entweder einfach an einer stärkeren Besiedlung dieser Körner mit *Fusarium* liegen, oder aber an einer Verlagerung von DON aus anderen Bereichen in die Körner (SNIJDERS UND KRECHTING 1992).

4.6.2 Korrelationen zwischen DON-Gehalt und anderen Parametern

Auch um die Bedeutung von DON oder anderer Trichothecene für das Pathosystem Weizen/*F. graminearum* zu untersuchen, sind Ähren-Inokulationen von großem Interesse und wurden vielfach durchgeführt. In solchen Untersuchungen werden mehrere *Fusarium*-Isolate zur Inokulation verwendet und Korrelationen zwischen beispielsweise dem DON-Gehalt der Körner zur Ernte und der Befallsstärke berechnet (SNIJDERS UND PERKOWSKI 1990, MUTHOMI *et al.* 2000, MESTERHAZY 2002). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass beide miteinander korrelierten Parameter im selben System gemessen werden, also keiner der beiden Faktoren nur *in vitro* bestimmt wird (WALKER *et al.* 2001). *In vitro*-Effekte können dadurch bei fehlender Korrelation als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

In den vorliegenden Versuchen wurden verschiedene Größen miteinander korreliert. Besonders Interesse galt hierbei der Korrelation zwischen dem DON-Gehalt und den verschiedenen Befallsparametern bzw. zwischen DON-Gehalt und Ernteparametern (Versuch 3). In allen Versuchen zeigten sich mehrere klare Tendenzen. So korrelierte der DON-Gehalt in aller Regel signifikant mit der Befallshäufigkeit, der Fläche unter der Befallskurve und der Befallsstärke. Dies galt innerhalb eines Isolats für verschieden stark befallene Ähren (Tab. 3.13 bis 3.16, 3.18, 3.23) und zwar unabhängig davon, ob die Isolate getrennt oder gemeinsam betrachtet wurden. Als Regression für den Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Befallshäufigkeit war in den meisten Fällen eine logarithmische Regression geeignet (Abb. 3.37, 3.42, 3.47). Auch wenn man die Isolate untereinander verglich ($n = 4$) zeigte sich für Versuch

1 und Versuch 2 eine signifikante Korrelation zwischen DON-Gehalt und Befall (Tab. 3.18). Ebenso lagen für Versuch 3 Korrelationen von $R = 0,90$ oder $R = 0,93$ vor, die aber nicht signifikant waren. Ein solcher Zusammenhang bedeutet, dass ein *F. graminearum*-Isolat, das gemittelt über den gesamten Befallszeitraum den höheren DON-Gehalt verursacht, auch die stärkeren Symptome hervorruft. DON hat daher eine wichtige Bedeutung für die Aggressivität eines *F. graminearum*-Isolats und kommt durchaus als Aggressivitätsfaktor in Betracht.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen MIEDANER *et al.* (2000) bei einer Untersuchung von 26 *F. graminearum*-Isolaten und einer Korrelation zwischen Befallssymptomen (gemittelt über den gesamten Zeitraum) und DON-Gehalt der Körner. GANG *et al.* (1998) stellten einen entsprechenden Zusammenhang für 34 *F. culmorum*-Isolate fest, MESTERHAZY UND BARTOK (1993) für insgesamt 4 Isolate (je zweimal *F. culmorum* und *F. graminearum*) und MESTERHAZY (2002) für 8 Isolate (je viermal *F. culmorum* und *F. graminearum*). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind außerdem Isolate solcher *Fusarium*-Arten, die DON oder andere Trichothecene vom B-Typ bilden, aggressiver als beispielsweise *F. sporotrichioides*, das diese Substanzen nicht bildet (BOTTALICO UND PERRONE 2002). Auch ein *F. acuminatum*-Isolat ist in einer Untersuchung von ATANASSOV *et al.* (1994) deutlich weniger aggressiv als vier von fünf *F. graminearum*- und *F. culmorum*-Isolaten. Gegen diese Vermutung spricht, dass ein Isolat von *F. sporotrichioides* bei WONG *et al.* (1995) eine starke Aggressivität verglichen mit den anderen *Fusarium*-Isolaten aufwies. *F. sporotrichioides* ist genau wie *F. acuminatum* Bildner der Typ-A-Trichothecene. Diese Substanzen sind je nach Zelltyp sehr viel zytotoxischer als die Trichothecene vom B-Typ (GUTLEB *et al.* 2002). Für T-2 Toxin konnte an Hamster-Fibroblasten eine 110fach höhere Zytotoxizität für T-2 Toxin als für DON festgestellt werden (ROTTER *et al.* 1993), für menschliche Lymphozyten sogar eine 1930fach höhere (VISCONTI *et al.* 1991). Es ist also bei solchen Untersuchungen grundsätzlich wichtig, alle in Frage kommenden möglichen Aggressivitätsfaktoren zu berücksichtigen. Um diese Frage auf Ebene der *Fusarium*-Arten zu klären, wären Arbeiten wünschenswert, die eine große Zahl von Isolaten verschiedener *Fusarium*-Arten auf ihre Aggressivität und Spektrum und Quantität der Toxinbildung in Ähren-Inokulationen untersuchen.

Hier ist anzumerken, dass die Zytotoxizität eines Mykotoxins nicht notwendigerweise korreliert sein muss mit der Phytotoxizität (MUTHOMI *et al.* 2000). So ist beispielsweise bei einem Vergleich von NIV und DON NIV das Toxin, das für den Menschen etwa 10mal toxischer ist (MIROCHA *et al.* 1994) und die höhere Zytotoxizität besitzt, was allerdings auch vom Zelltyp und verwendetem Test abhängt. So ist NIV in vier von sechs Studien zytotoxischer als DON

(GUTLEB *et al.* 2002). Nach SHIMADA UND OTANI (1990) aber wird das Spross- und Wurzelwachstum der Keimlinge verschiedener Weizen-Sorten durch DON gehemmt, nicht aber durch NIV. MUTHOMI *et al.* (2000) stellen fest, dass die aggressiveren *F. culmorum*-Isolate an Weizen DON-Bildner sind, die weniger aggressiven NIV-Bildner. Eine vergleichbare Beobachtung machten GANG *et al.* (1998) und MIEDANER *et al.* (2000) für *F. graminearum*. Da aber in letztgenannten Arbeiten nur sieben von 42 bzw. vier von 22 Isolaten zum NIV-Typ gehörten, bedarf diese Aussage durchaus einer Absicherung auf breiterer Datenbasis, denn beispielsweise PERKOWSKI *et al.* (1997) konnten bei dem Vergleich eines DON-Bildners und eines NIV-Bildners (*F. graminearum*) an Gerste zeigen, dass der NIV-Bildner aggressiver war. Es ist außerdem zu vermuten, dass die Menge an gebildetem NIV bzw. DON (quantitative Potenz) eine sehr wichtige Rolle spielt. So bildeten die vier NIV-Bildner bei MIEDANER *et al.* (2000) vergleichsweise weniger NIV als die DON-Bildner DON.

MESTERHAZY UND BARTOK (1993) stellen zwar einen generellen Zusammenhang zwischen DON-Gehalt und Aggressivität fest, doch berichten sie auch von einem *Fusarium*-Isolat, das kein DON bildete, aber trotzdem sehr aggressiv war. Auch GANG *et al.* (1998) berichten von einem *F. culmorum*-Isolat ohne DON- oder NIV-Bildung, das aber trotzdem deutliche Symptome hervorrief. Es spielen also anscheinend - wie schon mehrfach erwähnt - noch andere Faktoren für die Aggressivität von *Fusarium* an Weizen eine wichtige Rolle. Das wird auch in Abb. 3.43 und 3.49 deutlich. Die Regressionsgerade der Korrelation zwischen DON-Gehalt (x-Achse) und Befallshäufigkeit (y-Achse) schneidet die y-Achse in beiden Fällen nicht bei Null, sondern bei 31 % BH bzw. 44 % BH. Das heißt, dass also ein *F. graminearum*-Isolat, das kein DON bilden würde, eine deutliche Rest-Aggressivität besitzt. Dies setzt natürlich voraus, dass erstens eine lineare Regression in diesem Fall angemessen und zweitens eine Extrapolation auf einen DON-Gehalt von Null zulässig ist. Ein vergleichbares Bild bietet sich bei GANG *et al.* (1998), wo eine Extrapolation der Werte für den DON-Gehalt auf Null einen Symptomwert von etwa 3 (Skala von 1-9) ergeben würde. Neben anderen Trichothecen oder phytotoxischen Sekundär-Metaboliten allgemein kommen als weitere Aggressivitätsfaktoren noch Enzyme zum Abbau der Wirtszellwand in Betracht (WANYOIKE *et al.* 2002). So können GANG *et al.* (1998) feststellen, dass die Xylanase-Aktivität von *F. culmorum*-Isolaten von Bedeutung für ihre Aggressivität gegenüber Roggen-Keimlingen ist (Sprossbasis).

Ein weiterer experimenteller Ansatz, der die Bedeutung der Trichothecene für die Aggressivität von *Fusarium* unterstreicht, ist die Verwendung von Defekt-Mutanten oder gezielt hergestellten Defekt-Transformanten ("gene disruption"), die keine Trichothecene bilden können.

In der Regel wird hierbei das Gen Tri5 gezielt zerstört, das für die Trichodien-Synthase kodiert (PROCTOR *et al.* 2002). Trichodien ist ein Vorläufer-Molekül in der Trichothecen-Synthese. Solche Transformanten zeigen eine geringere Aggressivität als der Wildtyp. Dies konnten DESJARDINS *et al.* (1996) für *F. graminearum* an Weizen zeigen, ebenso wie HARRIS *et al.* (1999) an Mais und DESJARDINS *et al.* (1989) für *F. sporotrichioides* an Pastinak-Wurzeln (*Pastinaca sativa*). Aber auch hier sind die Ergebnisse durchaus nicht konsistent. DESJARDINS *et al.* (1992) konnten feststellen, dass ein *Gibberella pulicaris*-Transformant ohne Trichothecenbildung dieselbe Aggressivität gegenüber Kartoffelknollen besitzt wie der Wildtyp. Möglicherweise besitzen Kartoffelknollen die Fähigkeit, die Wirkung der Trichothecene auszuschalten (4.6.3). Ein vergleichbares Ergebnis erhalten PROCTOR *et al.* (1995) mit *F. graminearum*, wobei zwei verschiedene Transformanten nicht bei allen getesteten Getreide-Arten (nur bei einer Weizen-Sorte und an Mais) eine reduzierte Aggressivität gegenüber Keimlingen zeigten. Die Autoren diskutieren eine teilweise Wirtsspezifität des Mykotoxins DON als mögliche Ursache für diese Beobachtung. Eine andere Möglichkeit wären Änderungen im Stoffwechsel durch einen Überschuss an Farnesylpyrophosphat, das Substrat der Trichodien-Synthase (PROCTOR *et al.* 1995), und die daraus resultierende Synthese anderer toxischer Metabolite. DESJARDINS *et al.* (2000) stellten fest, dass ein nicht DON bildender Transformant von *F. graminearum* auch durch eine nachträgliche künstliche Wiederherstellung der Funktion des Gens Tri5 dennoch sowohl weniger DON bildet als auch weniger aggressiv ist. Dies spricht dafür, dass bei dem Eingriff ins Genom noch andere, beispielsweise die Aggressivität betreffende, Veränderungen stattgefunden haben könnten. PROCTOR *et al.* (1995) fanden außerdem sogar Unterschiede in der Aggressivität der beiden verwendeten Transformanten, was nicht der Fall sein dürfte, wenn sich diese beiden Stämme nur durch die fehlende Trichodien-Synthase-Funktion vom Wildtyp unterscheiden würden. Eine Veränderung beispielsweise des Gibberellinstoffwechsels könnte als unbeabsichtigter Nebeneffekt der Transformation eine Ursache für die über die verschiedenen Getreide-Arten nicht konsistenten Effekte sein, da als Parameter für die Aggressivität die Keimungsrate und die Sprosslänge der Jungpflanzen verwendet wurden. Gibberelline haben gerade auf die Entwicklung von Jungpflanzen einen Einfluss. Auch die Experimente von ADAMS UND HART (1989) machen deutlich, dass neben den Trichothecen auch andere Faktoren berücksichtigt werden müssen. Durch Protoplasten-Fusionen wurden *F. graminearum*-Stämme erzeugt, die keine Trichothecene bilden. Einige von ihnen wiesen dennoch die volle Aggressivität des Wildtyps auf. Obwohl diese Ergebnisse für die Interpretation von Arbeiten mit Transformanten eine gewisse Vorsicht anmahnen, kann als gesichert gelten, dass für Weizen und Mais die Aggressivität

von *F. graminearum* durch gezielte Genmanipulation reduziert werden kann. Dies kann als weiterer Hinweis dafür gelten, dass die Trichothecene, insbesondere DON, für *Fusarium* (vor allem *F. graminearum*) einen Aggressivitätsfaktor - keinen Pathogenitätsfaktor - darstellen, dass aber auch andere Komponenten einen Einfluss auf die Aggressivität haben können (DESJARDINS *et al.* 1996, HARRIS *et al.* 1999, PROCTOR *et al.* 2002). Wäre DON ein Pathogenitätsfaktor, so dürfte ein Isolat, das kein DON bildet, definitionsgemäß nicht pathogen sein (MITCHELL 1984).

Wie schon erwähnt konnten BAI *et al.* (2001) unter Verwendung eines transformierten *F. graminearum*-Isolats zeigen, dass DON eine wesentliche Rolle für die Ausbreitung im Wirt spielt, nicht aber für eine erste Infektion, denn bei einer Einzelähren-Inokulation wird das inokulierte Ährchen befallen, nicht aber die benachbarten Ährchen. EUDES *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Ährenspindel vom transformierten Stamm nicht erreicht wird. Für eine Rolle von DON für die Ausbreitung des Myzels spricht auch, dass das nahe verwandte ANIV wie bereits erwähnt die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Zellkulturen der Pappel hemmen konnte (VURRO UND ELLIS 1997). Wenn dieses Enzym gehemmt wird, das eine zentrale Rolle im Phenylpropan-Stoffwechsel und somit für mögliche Abwehrreaktionen der Pflanze einnimmt, so ist es wahrscheinlich, dass eine Besiedlung des Gewebes mit *F. graminearum* durch DON erleichtert wird.

Offensichtlich gibt es also Aggressivitätsfaktoren, die entweder für die primäre Infektion (möglicherweise Enzyme wie die Xylanase nach GANG *et al.* 1998, WANYOIKE *et al.* 2002) oder die folgende Besiedlung (mit hoher Wahrscheinlichkeit DON) von größerer Bedeutung sind. In Analogie zu der von SCHROEDER UND CHRISTENSEN (1963) geprägten Nomenklatur der Resistenzen von Weizen gegenüber *F. graminearum* erscheint ein entsprechendes System für die Aggressivität von *F. graminearum* angemessen. So wäre ein Aggressivitätsfaktor vom Typ I ein Faktor, der hauptsächlich für die Primärinfektion verantwortlich ist (analog zur Resistenz Typ I gegen Primärinfektion), während ein Aggressivitätsfaktor vom Typ II vor allem für die Ausbreitung im Wirt von Bedeutung wäre (analog zur Resistenz vom Typ II gegen Ausbreitung im Wirt). An dieser Stelle soll allerdings betont werden, dass es sich hierbei nur um eine Analogie handelt, nicht aber um ein Konzept für ein wirtsspezifisches System.

Auch für verschiedene Ernte-Parameter ergaben sich signifikante Korrelationen zum Befall und zum DON-Gehalt. Dies wurde zum einen aus den Messwerten der Kornmasse pro Ähre, der Tausendkornmasse (Tab. 3.28), des Körnerbefalls (Abb. 3.50) und der Korngrößenverteilung (Abb. 3.52) deutlich. In allen Fällen gibt es signifikante Unterschiede zwischen den vier

Isolaten und das Isolat mit der geringsten Aggressivität (und der geringsten DON-Bildung) gemittelt über die Vegetationsperiode wies die geringste Schädigung der Körner bzw. den höchsten Ertrag auf (Isolat 36). Dies zeigen auch die Korrelationskoeffizienten in Tab. 3.31 und 3.33b. Die engsten und zugleich höchst signifikanten Beziehungen bestanden zwischen Befallshäufigkeit und Fläche unter der Befallskurve auf der einen und Tausendkornmasse und Anteil der Körner > 2,8 mm auf der anderen Seite (Tab. 3.31). Auch zur Kornmasse pro Ähre bestand eine höchst signifikante Korrelation (Tab. 3.33b). Der Ertrag ist also ein sehr guter Parameter für die Aggressivität eines *F. graminearum*-Isolats. Für Versuche, in denen der Befallsverlauf an sich für die Fragestellung nicht von Interesse ist, könnte die Aggressivität eines *F. graminearum*-Isolats durch die Bestimmung der Ernte-Parameter mit vergleichsweise geringem Aufwand zuverlässig quantifiziert werden. So werden Ernte-Parameter als Grad für die Aggressivität auch in der Literatur vielfach genutzt (PERKOWSKI *et al.* 1997, MUTHOMI *et al.* 2000).

Der DON-Gehalt sowohl der Gesamtähre als auch der Körner korrelierte sehr stark mit dem Anteil stark befallener Körner und der Fläche unter der Befallskurve bzw. mit der Tausendkornmasse und der Kornmasse pro Ähre. Ähren oder Körner, die mehr DON enthalten, weisen also erstens einen größeren Anteil stark befallener Körner und eine größere FUBK auf und zweitens eine verringerte Kornmasse pro Ähre und eine verringerte Tausendkornmasse. Allerdings bestehen zu den meisten anderen Parametern auch höchst signifikante Korrelationen, so dass diese geringen Unterschiede im Korrelationskoeffizienten nicht überbewertet werden sollten. SUNDHEIM *et al.* (1997) können zwischen DON-Gehalt der Körner und dem Anteil stark befallener Körner bei der Untersuchung mehrerer Gerstensorten eine hoch signifikante Korrelation feststellen, nicht aber zur Symptomausprägung an der Ähre. Allerdings wurde hier auch nur ein Boniturtermin (4 Wochen nach Inokulation) verwendet und nicht über den gesamten Befallsverlauf gemittelt (GANG *et al.* 1998). Bei MUTHOMI *et al.* (2000) korrelierte die Tausendkornmasse ebenfalls signifikant mit dem DON- bzw. NIV-Gehalt der Körner.

Auch LEMMENS *et al.* (1997) stellten fest, dass bei einem Test von 108 Weizen-Sorten der Parameter FUBK enger als die BH (ein Boniturtermin) mit dem DON-Gehalt der Körner korrelierte. Bei dem DON-Gehalt der Ähre und insbesondere der Körner zur Ernte handelt es sich um den Endzustand einer Entwicklung, die mit der Inokulation zur Blüte begonnen hat. SNIJDERS UND KRECHTING (1992) vermuten eine Verlagerung von DON ins Korn schon bevor eine Besiedlung desselben stattgefunden hat. Wichtig ist daher nicht nur, wie stark der Befall

zu einem bestimmtem Zeitpunkt oder gemittelt über den Zeitraum bis zur Ernte war, sondern wie lange der Befall wie stark war. Ein Maß hierfür ist die Fläche unter der Befallskurve. Diese Korrelation ist je besser, desto gleichmäßiger über den Zeitraum die Akkumulation vonstattengeht, also desto weniger beispielsweise der Wirt beim Test verschiedener Sorten in diesen Prozess eingreift (MILLER *et al.* 1983b), sei es durch eine Hemmung der Synthese oder einen enzymatischen Abbau (4.6.3).

GANG *et al.* (1998) weisen darauf hin, dass es durchaus einen Unterschied macht, erstens welche Bezugsgröße für die DON-Bildung gewählt wird und zweitens zu welchem Zeitpunkt der DON-Gehalt der Ähren bzw. Körner gemessen wird. So stellen die Autoren wie schon erwähnt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem mittleren Befall und dem DON-Gehalt pro Gramm TM her, aber nicht zum DON-Gehalt pro Myzeleinheit. Als Maß für die Myzeleinheit wird meist der Ergosterol-Gehalt im Wirtsgewebe verwendet (MIEDANER *et al.* 2000, MESTERHAZY 2002). Ergosterol ist ein pilzspezifischer Membranbestandteil (SEITZ *et al.* 1979). Aber auch die Ermittlung des DNA-Gehalts der jeweiligen Art über spezifische PCR-Techniken ist möglich (DOOHAN *et al.* 1999). So ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen Ergosterol-Gehalt und dem Gehalt an spezifischer DNA (HARRIS *et al.* 1999). Bei einer geringen Kontamination des Bestandes mit anderen Pilzen ist auch der Ergosterol-Gehalt ein geeigneter Parameter zur Quantifizierung der Myzelmenge. Der Parameter DON/Myzeleinheit ist dazu geeignet, den DON-Gehalt unabhängig vom Grade der Besiedlung des Wirts vergleichbar darzustellen. Ein höherer DON-Gehalt einer Ähre kann auch auf eine stärkere Besiedlung des Gewebes mit Myzel zurückzuführen sein, und muß nicht automatisch bedeuten, dass das entsprechende *F. graminearum*-Isolat auch tatsächlich ein stärkerer DON-Bildner ist. GANG *et al.* (1998) ziehen daraus den Schluss, dass der DON-Gehalt bezogen auf die Trockenmasse nur eine eingeschränkte Aussagekraft für die Rolle von DON als Aggressivitätsfaktor hat und dass DON nur dann mit Sicherheit ein Aggressivitätsfaktor ist, wenn die stärkeren Symptome (und somit höhere Aggressivität eines Isolats) eindeutig auf die höhere DON-Bildung bei gleicher Myzelmenge zurückzuführen sind.

Diese Schlussfolgerung ist allerdings nicht zwingend und die Bestimmung der Myzelmenge für eine stichhaltige Aussage unter bestimmten Annahmen nicht erforderlich, wie ein Beispiel verdeutlichen soll: *F. graminearum*-Isolat A sei ein Isolat, das einen höheren DON-Gehalt verursacht und einen stärkeren Befall hervorruft, also über eine höhere Aggressivität verfügt, während *F. graminearum*-Isolat B einen niedrigeren Gehalt an DON verursacht und einen geringeren Befall hervorruft, also weniger aggressiv ist. Alle anderen möglichen Aggressivi-

tätsfaktoren werden in dieser Betrachtung zur Vereinfachung vernachlässigt. Wenn keine Information über die gebildete Myzelmenge der beiden Isolate vorliegt, so ergeben sich drei mögliche Fälle.

Die erste Möglichkeit ist, dass von Isolat A und B gleichviel Myzel gebildet worden ist, also eine gleich starke Besiedlung des Wirtes vorliegt. In diesem Fall würde Isolat A also mehr DON pro Myzeleinheit bilden. Der Grund für die höhere Aggressivität dieses Isolats A könnte dann nicht in einer höheren Besiedlung des Wirtsgewebes liegen, sondern der einzige mögliche Grund wäre die stärkere DON-Bildung durch Isolat A. In diesem Fall wäre DON ohne Frage ein Aggressivitätsfaktor (MITCHELL 1984).

Im zweiten Fall hat Isolat A weniger Myzel gebildet als Isolat B, also Isolat A hat den Wirt schwächer besiedelt. Auch in diesem Fall bildet Isolat A mehr DON pro Myzeleinheit als Isolat B. Eine stärkere Besiedlung kommt in diesem Fall erst recht nicht als Grund für die höhere Aggressivität von Isolat A infrage. Auch hier wäre DON eindeutig ein Aggressivitätsfaktor.

Die dritte Möglichkeit ist, dass Isolat A mehr Myzel gebildet hat als Isolat B, den Wirt also stärker besiedelt hat. Auch in diesem Fall kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass DON ein Aggressivitätsfaktor ist. Hier gilt es, die Frage nach Ursache und Wirkung zu klären, denn die DON-Bildung könnte die Folge einer starken Besiedlung sein, aber auch der umgekehrte Fall wäre denkbar. Wahrscheinlich ist, dass sich in einem dynamischen Prozess beide Faktoren fortlaufend gegenseitig beeinflussen (Abb. 4.1). Aus der Literatur ist bekannt, dass DON in noch unbesiedelte Bereiche der Ähre verlagert werden kann (KANG UND BUCHENAUER 1999). Außerdem zeigten Versuche mit Trichothecen-Defekt-Transformanten von *F. graminearum*, dass DON eine wichtige Rolle für die Ausbreitung des Myzels im Wirtsgewebe spielt (BAI *et al.* 2001, EUDES *et al.* 2001). Es spricht daher einiges dafür, dass ein höherer DON-Gehalt erst die stärkere Besiedlung des Wirtes in Fall 3 ermöglicht. Unter dieser Voraussetzung ist DON auch im 3. Fall ein Aggressivitätsfaktor. Allerdings ist nicht zu klären, ob die Aggressivität von Isolat A in diesem 3. Fall direkt auf der Wirkung von DON beruht, oder ob die Wirkung durch die Förderung der Myzelbildung eine indirekte ist, also bei DON eher von einem indirekten Aggressivitätsfaktor zu sprechen wäre.

GANG *et al.* (1984) konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Befallshäufigkeit und dem DON-Gehalt pro Myzeleinheit in den Körnern feststellen und schließen daraus, dass DON zwar eine Rolle für das Wirt/Parasit-System spielt, es aber unerheblich ist, wieviel

DON gebildet wird. Eine Untersuchung der Körner auf DON liefert, wie schon erwähnt, den Endzustand der DON-Produktion oder DON-Akkumulation in den Körnern über den gesamten Befallszeitraum (MIEDANER *et al.* 2000). Der Parameter Befallshäufigkeit wurde hingegen über den gesamten Zeitraum gemittelt. Also wäre es sinnvoller, auch den DON-Gehalt nicht nur an einem Messwert zum Ende des Versuchs, sondern durch sequentielle Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen (Abb. 3.36, 3.41, 3.46). Gerade weil DON eine wichtige Rolle für die Ausbreitung des Myzels im Wirtsgewebe spielt, ist außerdem zu vermuten, dass nicht der DON-Gehalt zur Ernte, sondern der DON-Gehalt zu einem früheren Zeitpunkt der Pathogenese, beispielsweise in der Phase der Etablierung des Myzels, eine wichtige Rolle spielt.

Dies war ein weiterer Grund, in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung des DON-Gehalts von Weizenähren nach Inokulation mit verschiedenen *F. graminearum*-Isolaten über den gesamten Zeitraum der Pathogenese in seiner Dynamik zu untersuchen. Auf diese Weise sollten möglicherweise vorhandene Kardinalpunkte aufgefunden werden, an denen DON eine Schlüsselfunktion einnimmt und eine enge Korrelation zur Aggressivität besteht. Nach den Ergebnissen aus Tab. 3.19 und Tab. 3.27 ist die Qualität der Beziehung zwischen dem DON-Gehalt und dem Befall tatsächlich vom Zeitpunkt der Probennahme abhängig. Nicht zu allen Zeitpunkten ist diese Beziehung signifikant. Für Versuch 1 und 2 war die Beziehung bei 21 dpi am engsten (Tab. 3.19 und Anhang A.10), für den Versuch 3 war dieser Termin vom verwendeten Befallsparameter abhängig (Tab. 3.27, Anhang A.10). Dies macht deutlich, dass die Korrelationen sowohl durch die Versuchsdurchführung als auch die Wahl der Parameter beeinflusst werden. Eine eindeutige Aussage zum Zeitpunkt der engsten Korrelation zwischen DON-Gehalt und Aggressivität ist auf der vorliegenden Datenbasis nicht möglich. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass die engsten Korrelationen für Versuch 1 und 2 bzw. Versuch 3 hauptsächlich im mittleren Bereich der Pathogenese auftraten (21 dpi und 35 dpi). Die Korrelation war in keinem Fall für einen der drei letzten Wochen vor Versuchsende am engsten (Versuch 1 und 2: 28 dpi bis 42 dpi, Versuch 3: 43 dpi bis 56 dpi). Dies könnte erklären, weshalb der DON-Gehalt der Körner nicht immer mit dem Befall korreliert (SUNDHEIM *et al.* 1997).

Die Tatsache, dass DON möglicherweise in bestimmten Stadien der Pathogenese eine größere Bedeutung besitzt als zu anderen Zeitpunkten, wird in der Literatur zwar diskutiert (GANG *et al.* 1998, MIEDANER *et al.* 2000), aber Daten zu dieser Fragestellung sind m. E. bisher noch nicht erhoben worden. In ähnlichen Arbeiten wurde bisher entweder der gesamte Befallsver-

lauf verfolgt, ohne zeitabhängig Korrelationen zu berechnen (BAI *et al.* 2001), oder aber die Autoren berechnen Korrelationen, nehmen aber keine Daten für den gesamten Befallsverlauf auf (GANG *et al.* 1998, MUTHOMI *et al.* 2000).

Während die Parameter DON 1 ($\mu\text{g DON/g TM}$) und DON 3 ($\mu\text{g DON/Ähre}$) bezüglich ihrer Korrelationen zu den Befallsparametern vergleichbare Ergebnisse zeigen, unterscheiden sich die Korrelationen für den Parameter DON 2 ($\mu\text{g DON/g befallene TM}$) erheblich davon (Tab. 3.18, 3.19, 3.25, 3.27, Anhang A.10). So bestand bei einer Mittelwertbildung über die gesamte Pathogenese bei keinem der Versuche eine signifikante Beziehung zwischen DON 2 und BH oder FUBK (Tab. 3.18, 3.25), wohl aber bei einer einzelnen Betrachtung der verschiedenen Probenahme-Termine. Für DON 1 bestand nur in Versuch 3 keine signifikante Beziehung. Diese Aussage über DON 2 könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass DON nicht nur im sichtbar befallenen Ährengewebe vorhanden ist, sondern auch in andere Bereiche verlagert wird (SNIJDERS UND KRECHTING 1992). Dass aber dennoch zu verschiedenen Zeitpunkten (abhängig vom jeweiligen Versuch) signifikante Korrelationen zwischen DON 2 und den Befallsparametern auftreten (Anhang A.10) spricht möglicherweise dafür, dass diese Verlagerung von DON zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlicher Intensität erfolgt. Interessanterweise tritt die früheste signifikante Korrelation für DON 2 erst 14 dpi auf, während DON 1 und DON 3 auch schon früher signifikante Zusammenhänge zeigen. Dies wiederum könnte ein Hinweis darauf sein, dass gerade in frühen Stadien der Besiedlung der Ähre eine starke Verlagerung von DON über die sichtbar befallenen Bereiche hinaus stattfindet und würde somit die Bedeutung von DON für die Besiedlung des Wirtes untermauern. Weitere Untersuchungen der Dynamik und Korrelation der DON-Bildung mit einer größeren Anzahl von *F. graminearum* verschiedener Aggressivität möglicherweise unter Freilandbedingungen mit mehreren Probenahmeterminen über die gesamte Pathogenese wären wünschenswert.

4.6.3 Vergleich der Sorten Picolo und Frontana

Zwischen den beiden Sommerweizen-Sorten Picolo und Frontana bestand ein deutlicher Unterschied in der Resistenz gegenüber *F. graminearum* (Abb. 3.55 bis 3.57). Picolo ist gegenüber den Ährenfusariosen als mittelanfällig klassifiziert, die Sorte Frontana gilt als resistent, was von vielen Autoren bestätigt wird (MILLER UND ARNISON 1986, WANG UND MILLER 1988, SINGH *et al.* 1995, MILLER UND EWEN 1997, SIRANIDOU *et al.* 2002).

Ähren der resistenten Sorte Frontana enthielten nach künstlicher Inokulation mit *F. graminearum* signifikant weniger DON als Ähren der Sorte Picolo (Abb. 3.56). Die Befallshäufigkeit der Ährchen von Frontana war zu Beginn der Pathogenese ebenfalls signifikant niedriger, glich sich ab 28 dpi aber immer stärker der Befallshäufigkeit von Picolo an. Zu Versuchsende war ein vergleichbares Befallsniveau erreicht (Abb. 3.55). Auffällig war, dass in späteren Stadien der Pathogenese eine Diskrepanz zwischen dem DON-Gehalt und der Befallshäufigkeit bei Frontana bestand. Die Korrelationen zwischen DON-Gehalt und BH bzw. FUBK waren für beide Sommerweizen-Sorten auf Basis der Einzelproben signifikant (Tab. 3.35 und 3.36). RIBICHICH *et al.* (2000) konnten ebenfalls eine verzögerte Symptomausprägung in der resistenteren von zwei untersuchten Weizensorten feststellen.

Die Halme der Sorte Frontana waren signifikant länger als die der Sorte Picolo. Gerade stark anfällige Sorten wie z. B. der Winterweizen Hanseat besitzen sehr geringe Halmlängen. Im Feld könnte die größere Nähe der Ähren zum Boden und somit zum Primär-Inokulum eine Rolle spielen. Dieser Zusammenhang dürfte bei künstlichen Infektionen an der Ähre aber eigentlich nicht bestehen. Es ist aber zu vermuten, dass die Ähren von Sorten mit kürzeren Halmen durch den dichteren Bestand einem anderen Mikroklima ausgesetzt sind als bei längeren Halmen. Insgesamt war die resistente Sorte Frontana vom Verlauf der Pathogenese, des DON-Gehalts und der Korrelationen mit dem Isolat 36 vergleichbar, das von den vier untersuchten *F. graminearum*-Isolaten signifikant am wenigsten DON bildete.

Auch bei MESTERHAZY (2002) traten vergleichbare Korrelationen bei verschiedenen *Fusarium*-Isolaten bzw. Weizensorten auf, so dass sich eine ähnliche Bedeutung von DON für die Aggressivität von *F. graminearum* und die Resistenz gegen *F. graminearum* vermuten lässt. Für verschiedene Weizensorten besteht bei einer Ähren-Inokulation in der Regel ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Befallssymptomen an der Ähre und dem DON-Gehalt der Körner (BAI *et al.* 2001, MIEDANER *et al.* 2001, MUTHOMI *et al.* 2002b). LIU *et al.* (1997) konnten diesen Zusammenhang nicht feststellen, aber dafür eine Korrelation zwischen dem DON-Gehalt und dem Anteil schwer befallener Körner. Offensichtlich ist ähnlich wie schon bei dem Vergleich von *Fusarium*-Isolaten verschiedener Aggressivität die Wahl eines geeigneten Befallsparameters wichtig (SUNDHEIM *et al.* 1997). MIEDANER UND PERKOWSKI (1996) beobachteten, dass es bei Feldversuchen auch stark von den Umweltbedingungen (Faktor Versuchsjahr) abhängen kann, ob eine Korrelation zwischen dem DON-Gehalt und der Symptomausprägung verschiedener Roggensorten besteht.

In der Literatur wurden verschiedene Resistenzmechanismen von Weizen gegen Ährenfusariosen beschrieben (SCHROEDER UND CHRISTENSEN 1963, LIU *et al.* 1997, MIEDANER 1997, MESTERHAZY 2002). SCHROEDER UND CHRISTENSEN (1963) beschrieben die ersten beiden Resistenz-Typen und klassifizierten sie als I und II, wobei der Typ I die Resistenz gegen die Primärinfektion ist, Typ II die Resistenz gegen die Ausbreitung im Wirt, wie vormals unter 4.6.2 erwähnt. KANG UND BUCHENAUER (2000) konnten feststellen, dass sich nach einer Inokulation mit *F. culmorum* der Erreger im Gewebe von Frontana langsamer ausbreitet als in einer anfälligeren Sorte (Agent), und führen das auf einen erhöhten Ligningehalt in den Zellwänden von Frontana zurück. Außerdem enthielt die anfälligere Sorte in frühen Stadien der Infektion signifikant mehr DON. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Frontana über eine Resistenz vom Typ II verfügt. Dies konnte in diesem Versuch aber nur zum Teil bestätigt werden, denn ab 28 dpi trat in der Symptomausprägung der Ähren von Frontana und Picolo kein signifikanter Unterschied mehr auf (Abb. 3.55). Hierbei könnte aber auch die Tatsache eine Rolle spielen, dass bedingt durch die generell stärkere Pigmentierung der Frontana-Ähren eine Bonitur vor allem in späteren Stadien der Pathogenese erschwert und der Befall dadurch möglicherweise überschätzt wurde. Die stärkere Pigmentierung bei Frontana könnte auch ein Hinweis auf die von KANG UND BUCHENAUER (2000) beschriebene stärkere Lignifizierung sein. Für eine Resistenz vom Typ II spricht die Beobachtung, dass die durch die Primärinfektionen verursachten Verbräunungen bei Frontana länger auf die einzelnen Ährchen beschränkt blieben als bei Picolo. Auch die von PRITSCH *et al.* (2001) beschriebene systemische Expression von Resistenzgenen in noch nicht befallenen Bereichen dürfte zur Typ II-Resistenz beitragen. Als weitere Resistenz-Typen werden die Resistenz gegen eine Infektion der Körner (Typ III), eine Toleranz gegenüber einer Infektion (hoher Ertrag trotz hohem Befall, Typ IV) und eine Resistenz gegen DON (Typ V) diskutiert (MILLER *et al.* 1985, MESTERHAZY 1995, LIU 1997, MESTERHAZY 2002), wobei Typ III und IV keine Resistenzen im strengen Sinne, sondern spezielle Fälle von Toleranz sind (MIEDANER 1997). Weitere Mechanismen für eine Toleranz gegenüber DON wurden von MILLER UND EWEN (1997) beschrieben. Ribosomen der Sorte Frontana sind gegen eine Hemmung der Protein-Biosynthese durch DON, einen Wirkmechanismus der Trichothecene, resistenter als eine anfällige Sorte. Auch die Zellmembranen zeigten eine höhere Resistenz gegenüber dem durch Trichothecene geförderten Elektrolyt-Efflux. HARRIS UND GLEDDIE (2001) gelang es, durch Transformation mit einem modifizierten Gen aus Hefe, das für ein ribosomales Protein kodiert (60S-Untereinheit), Tabak-Pflanzen erhöhter Toleranz gegenüber DON zu erzeugen.

Der Typ V der Resistenz wurde von MILLER *et al.* (1985) beschrieben, die feststellten, dass resistente Weizensorten (unter ihnen Frontana) pro Myzeleinheit von *F. graminearum* weniger DON enthielten. Hieraus schließen die Autoren, dass diese Sorten in der Lage sind, entweder die DON-Bildung zu verhindern, oder aber DON enzymatisch abzubauen. Auch der Verlauf des DON-Gehalts in Abb. 3.56 macht deutlich, dass bei Frontana am Ende der Vegetationsperiode trotz vergleichbarer Symptomausprägung (Abb. 3.55) signifikant weniger DON vorhanden ist. Setzt man eine vergleichbare Besiedlung voraus, so liegt auch hier eine größere Menge DON pro Myzeleinheit vor. Einen weiteren Hinweis auf eine Metabolisierung von DON durch den Wirt liefern die schon unter 4.6.1 skizzierten Beobachtungen zur Abnahme des DON-Gehalts in Feldversuchen zum Ende der Vegetationsperiode (MILLER *et al.* 1983b, SCOTT *et al.* 1984, MILLER UND YOUNG 1985, CHEN *et al.* 1996).

Es ist bekannt, dass Pflanzen in der Lage sind, Xenobiotika durch in der Regel drei gekoppelte Reaktionsphasen (Transformation, Konjugatbildung und Kompartimentierung) aus ihrem Stoffwechsel auszuschließen (SANDERMANN 1992, KREUZ *et al.* 1996). MILLER UND ARNISON (1986) konnten nachweisen, dass DON in Zellkulturen zweier verschiedener Weizensorten metabolisiert wurde. Bei der resistenteren der beiden Sorten (Frontana), wurden in 72 Stunden 18 % des eingesetzten DON metabolisiert, wobei drei Metaboliten nachgewiesen wurden. Von der anfälligeren Sorte waren nur 5 % des DON umgesetzt. Als Hauptmetabolit vermuteten die Autoren ein Glucosid, klärten die Struktur aber nicht auf. In ähnlicher Weise wurde DON in Mais-Zellkulturen innerhalb von 15 Tagen zu 48 % zu drei Metaboliten umgewandelt (SCHUSTER 1988). Die spätere Strukturaufklärung für den Hauptmetaboliten ergab, dass es sich tatsächlich um ein Glucosid handelte (3 β -D-Glucopyranosyl-4-desoxynivalenol) (SEWALD *et al.* 1992). Auch in Rohhomogenaten von Weizenblättern konnte schon eine Umwandlung von DON *in vitro* gezeigt werden (YAO *et al.* 1996). Auch hier wurde der Metabolit nicht näher charakterisiert.

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einige Versuche zum enzymatischen Abbau von DON durch Rohhomogenate verschiedener Weizensorten durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). In diesen Versuchen wurde mit Enzymrohhomogenaten der Sorte Frontana gearbeitet. Als Vergleichssorte diente die Sorte Hanseat (stark anfällig). Die ersten Ergebnisse sprachen tendenziell für den auch in der Literatur beschriebenen Metabolismus. Nach 14 Stunden Inkubation bei 23 °C war eine Abnahme des DON-Gehalts um 12 % bei den Rohhomogenaten der Sorte Frontana zu erkennen, bei denen der Sorte Hanseat lag der Wert im

Bereich der Kontrolle. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Versuchen bisher nicht abgesichert werden.

Neben dem Glucose-Transfer ist die Acetylierung der Trichothecene eine mögliche Entgiftungsreaktion. So wird *F. graminearum* durch eine 3-O-Acetyltransferase vor der toxischen Wirkung der Trichothecene geschützt (KIMURA *et al.* 1998). Transformationsexperimente von OKUBARA *et al.* (2002) zeigten, dass Weizen-Transformanten, die eine Trichothecen-Acetyltransferase von *F. sporotrichioides* exprimierten, eine höhere Resistenz gegen die Ausbreitung des Myzels von *F. graminearum* als der Wildtyp aufwiesen (Abb. 4.1). Von einer Eliminierung der 12,13-Epoxygruppe von DON wurde bisher nur durch Mikroorganismen, beispielsweise im Pansen von Wiederkäuern (KING *et al.* 1984) berichtet, nicht aber durch Pflanzen. Die Ergebnisse von BINDER *et al.* (1997) sprechen dafür, dass im Pansen Reduktionsreaktionen zur Entgiftung von DON stattfinden.

Obwohl eine Metabolisierung von DON durch den Wirt bisher zwar prinzipiell nachgewiesen worden ist, sind die verfügbaren Informationen nicht zufriedenstellend (KARLOVSKY 1999). Es ist nicht bekannt, welcher Hauptmetabolit von Weizen gebildet wird oder welche Enzyme und Cosubstrate an dieser Reaktion beteiligt sind. Ein weiteres Problem besteht darin, dass bei einer Konjugatbildung durch die Pflanze das Mykotoxin - wenn auch in konjugierter Form - in der Pflanze und somit im Nahrungs- oder Futtermittel enthalten bleibt. Es ist zu prüfen, inwieweit konjugiertes DON im Verdauungstrakt von Mensch und Tier wieder freigesetzt wird. Ein möglicher Vorteil der Konjugatbildung wäre aber trotzdem, dass durch die enge Verknüpfung zwischen DON-Bildung und Myzel-Wachstum (Abb. 4.1) insgesamt eine geringere Belastung mit Mykotoxinen vorliegen könnte.

Auch ein erhöhter Gehalt an phenolischen Substanzen trägt zur Resistenz von Weizen gegenüber *Fusarium* bei. Besonders zu erwähnen sind hier die Ferulasäure und die p-Coumarsäure (MCKEEHEN *et al.* 1999, SIRANIDOU *et al.* 2002), die in den infizierten Spelzen der Sorte Frontana in signifikant höheren Konzentrationen auftraten als bei der anfälligeren Vergleichssorte. Für eine wichtige Rolle von pflanzlichen Inhaltsstoffen für eine Resistenz gegen *F. graminearum* sprach auch eine Beobachtung, die am Rande der vorliegenden Arbeit gemacht werden konnte. Die Sporenkeimung von *F. graminearum*-Sporen auf Wasser-Agar wurde von wässrigen Antheren-Extrakten konzentrationsabhängig gehemmt (Ergebnisse nicht gezeigt).

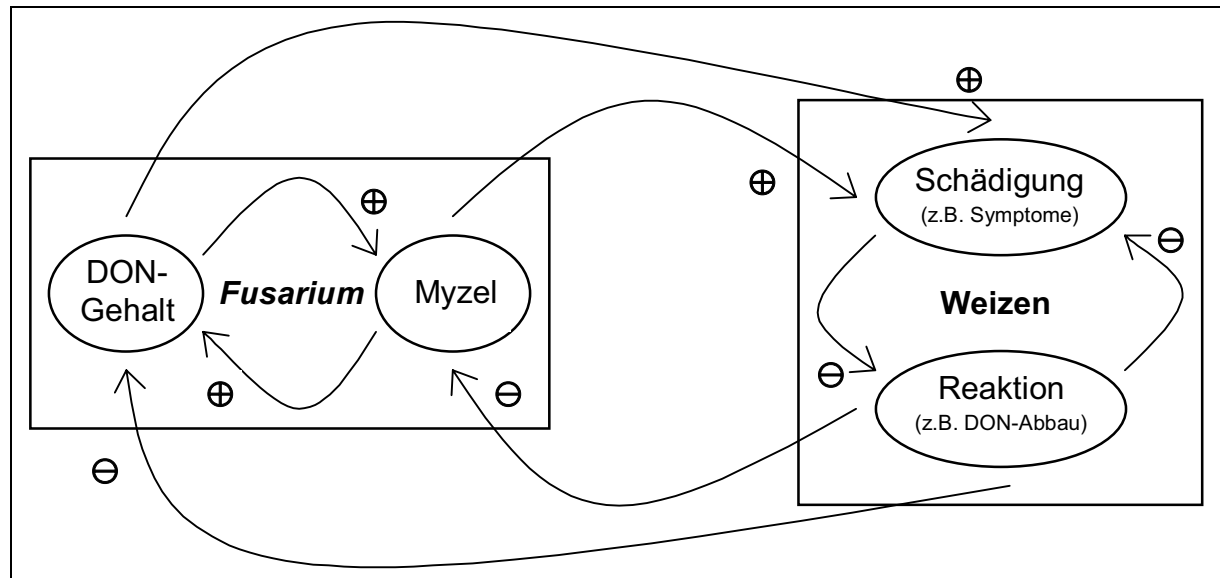


Abbildung 4.1: Schematisierte Darstellung vermuteter Interaktionen im Wirt/Parasit-System Weizen/*Fusarium graminearum*. \oplus = je mehr, desto mehr bzw. je weniger, desto weniger. \ominus = je mehr, desto weniger bzw. je weniger, desto mehr.

Zusammengefasst aus voneinander unabhängigen Untersuchungen könnte sich für die Resistenz von Weizen gegenüber einem DON bildenden *Fusarium*-Isolat folgendes Szenario ergeben (Abb. 4.1): Schon zur Sporenkeimung 6 bis 12 h nach Inokulation (KANG UND BUCHENAUER 1999) können die ersten Transskripte von Resistenzgenen nachgewiesen werden (PRITSCH *et al.* 2000). Nach erfolgreicher Primär-Infektion (denn Frontana verfügt offenbar über keine Typ I-Resistenz) nach etwa 36 h erreicht die Konzentration dieser Transkripte ihr Maximum. Das Myzel beginnt, sich auszubreiten, und es wird in verstärktem Maße DON gebildet. In anfälligen Sorten hemmt DON die Induktion der PAL (VURRO UND ELLIS 1997) und somit die Bildung phenolischer Substanzen (z. B. Ferulasäure, MCKEEHAN *et al.* 1999) sowie von Lignin-Inkrustierungen in die Zellwände (KANG UND BUCHENAUER 2000). Andererseits wird durch DON in Sorten, deren Ribosomen nicht DON-tolerant sind (MILLER UND EWEN 1997), die Proteinbiosynthese generell gehemmt und dadurch auch weitere Resistenzreaktionen verzögert. DON wird in anfälligen Sorten nun verstärkt in noch unbefallene Ähren-Bereiche verlagert (KANG UND BUCHENAUER 1999), in denen die systemische Expressierung von Resistenzgenen stattgefunden hat (PRITSCH *et al.* 2002). In resistenten Sorten ist die Verlagerung von DON geringer, da eine enzymatische Metabolisierung von DON erfolgt (MILLER UND ARNISON 1986). Dadurch breitet sich das Myzel nicht so schnell und weit aus, da außerdem durch verstärkte Lignifizierung, Papillenbildung und Produktion von phenolischen Substanzen eine Ausbreitung im Gewebe erschwert wird (KANG UND BUCHENAUER

2000, SIRANIDOU *et al.* 2002). Benachbarte Ährchen werden nicht besiedelt, die Ährenspindel wird nicht erreicht.

4.7 Ausblick

Die weltweite intensive Forschung hat deutliche Fortschritte im Verständnis des Wirt/Parasit-Systems Weizen/*Fusarium graminearum* gebracht. Dennoch besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf. Bei der Komplexität der Interaktionen zwischen Pilz und Pflanze wäre es von Vorteil, weitere Faktoren eindeutig zu identifizieren, die neben den Trichothecen im allgemeinen und DON im besonderen zur Aggressivität eines *Fusarium graminearum*-Isolats beitragen. Hierbei sind einfache aber trotzdem möglichst naturnahe Keimlingstests zu empfehlen, bei denen die simultane Messung vieler infrage kommender Faktoren wie beispielsweise pilzlicher Sekundärstoffe und Enzymaktivitäten möglich ist. Sinnvoll könnte hier die Herstellung von Defekt-Transformanten für die gefundenen Faktoren sein. In Ähren-Inokulationen sollten alle bedeutenden Trichothecen bildenden *Fusarium*-Arten mit einbezogen werden und die Dynamik des Befalls und der Toxinbildung über die gesamte Pathogenese für eine ausreichend große Zahl *Fusarium*-Isolate und Weizen-Sorten durchgeführt werden. Auch die Einflüsse der Mikroflora der Weizenähre spielen hier eine wichtige Rolle und müssen weiter untersucht werden. Die vollständige Aufklärung des natürlich auftretenden DON-Metabolismus in der Pflanze und die konsequente Nutzung in der Pflanzenzüchtung wären wünschenswert. Ansätze zur Herstellung gentechnisch veränderter Kulturpflanzen durch Transformation mit Resistenzgenen anderer Herkunft liefern vielversprechende Ergebnisse. Jedoch ist in wissenschaftlicher und ethischer Hinsicht unter Abschätzung der Chancen und der möglichen Risiken und in Verantwortung vor Gott und den Menschen sorgfältig zu prüfen, inwieweit dies ein primärer Lösungsansatz für die Zukunft sein kann. Besonders im Zusammenhang mit der aktuellen Grenzwert-Diskussion für Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln ist es dringend erforderlich, dass die Analytik der Trichothecene und von Zearalenon empfindlicher und reproduzierbarer wird. Eine stärkere Standardisierung ebenso wie die Entwicklung schneller und zugleich wenig störanfälliger diagnostischer Verfahren, die auch nach kurzer Einarbeitung vielerorts zuverlässig und effektiv angewandt werden können, ist zwingend notwendig.

5. Zusammenfassung

Die Ährenfusariosen gehören vor allem durch die Kontamination des Ernteguts mit Mykotoxinen zu den bedeutendsten Krankheiten des Getreides, insbesondere des Weizens. Um deutlichere Erfolge in der herkömmlichen Bekämpfung erzielen oder neue Bekämpfungsstrategien entwickeln zu können, ist eine genaue Kenntnis der komplexen Interaktionen im Wirt/Parasit-System unerlässlich.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Bedeutung der Mykotoxine - insbesondere Deoxynivalenol (DON) - für das Wirt/Parasit-System Weizen/*Fusarium graminearum* zu leisten. Hierzu wurde eine Methode zur HPLC-Analytik der Trichothecene vom B-Typ evaluiert und im Institut etabliert.

Durch eine Untersuchung der *in vitro*-Toxinbildung von 47 *Fusarium*-Isolaten, deren taxonomische Einordnung molekularbiologisch abgesichert wurde, sollte ihr Toxinbildungspotential qualitativ und quantitativ untersucht werden. Ein naturnaher Biotest an jungen Weizenpflanzen diente dazu, die Aggressivität dieser *Fusarium*-Isolate zu bestimmen. Die Korrelationen zwischen Toxinbildungsvermögen *in vitro* und der Aggressivität im Biotest sollten getestet werden, um möglicherweise einen Hinweis auf die Bedeutung der Mykotoxine - insbesondere von Deoxynivalenol - für das Wirt/Parasit-System zu geben.

In Ähren-Inokulationen an Sommerweizen unter kontrollierten Bedingungen sollten die Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen an einer geringeren Anzahl *F. graminearum*-Isolate verifiziert werden. Ein weiterer wichtiger Grund für die Ähren-Inokulationen war die Frage, wie sich die zeitliche Dynamik der DON-Bildung verschiedener Isolate über die gesamte Pathogenese verhält und ob sich bestimmte Zeitpunkte durch eine besonders deutliche Korrelation zur Aggressivität auszeichnen, ob also Phasen festgestellt werden können, in denen die Rolle von DON besonders wichtig ist. Ein solcher Vergleich zwischen verschiedenen Isolaten ist aus der Literatur m. E. nicht bekannt. In einem weiteren Versuch wurde die DON-Bildungs-Dynamik an zwei Weizensorten verschiedener Resistenz untersucht.

1. Eine Methode zur Analytik der B-Typ-Trichothecene mit Aufreinigung der Wasser/Methanol-Extrakte an Extrelut NT3-Fertigsäulen und RP-HPLC mit UV-Detektion der Trichothecene ($\lambda = 220 \text{ nm}$) wurde am Institut etabliert. Neben den vier Trichothecenen DON, ADON, NIV und ANIV konnte auch das deutlich apolarere Zearalenon im selben Mess-Lauf quantifiziert werden. Diese Methode liegt mit einer Nachweisgrenze für DON von 0,1 bis 0,5 ppm im Bereich anderer Verfahren, die eine vergleichbare Technik verwenden.

Für Fragestellungen, die eine bessere Nachweisgrenze und höhere Empfindlichkeit erfordern, wäre eine kostspieligere Aufreinigung der Extrakte mit Mycosep-Säulen und eine Nachsäulen-Derivatisierung der Trichothecene empfehlenswert.

2. Die taxonomische Einordnung der *Fusarium*-Isolate mit PCR-Methodik stimmte sehr gut mit der mikroskopisch-morphologischen Bestimmung überein. Es wurden 38 reine *F. graminearum*-Isolate identifiziert, ein reines *F. culmorum*-Isolat und sieben Misch-Isolate (*F. graminearum* und *F. culmorum*), in denen in fünf Fällen *F. graminearum* dominierte und ein *F. avenaceum*/*F. graminearum*-Misch-Isolat auftrat.

3. Die Versuche zur Toxinbildung *in vitro* zeigten einen charakteristischen Wechsel der Dominanz von ADON in früheren Stadien zu DON in späteren Stadien. Weiterhin konnte die Ausbildung von Chemotypen beobachtet werden, wobei von den untersuchten 47 Isolaten 43 zum DON-Chemotyp gehörten und drei zum NIV-Chemotyp. Für ein Isolat (*F. avenaceum*/*F. graminearum*-Misch-Isolat) konnten keine Trichothecene vom B-Typ nachgewiesen werden. Eine Bildung von NIV von DON-Chemotypen oder andersrum konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Neben diesen qualitativen Unterschieden traten auch signifikante quantitative Unterschiede auf. Während eine signifikante Korrelation zwischen DON- und ADON-Bildung bestand, konnte eine Beziehung zwischen Trichothecen- und Zearalenon-Bildung nicht festgestellt werden.

4. Auch in der Aggressivität gegenüber jungen Weizen-Pflanzen traten signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Isolaten auf. Eine signifikante Korrelation zu den Ergebnissen aus der Toxinbildung *in vitro* konnte allerdings nicht festgestellt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wäre ein Ansatz erfolgsversprechender, in dem Aggressivität und Toxinbildung im selben System gemessen werden.

5. In den Ähren-Inokulationen (Sommerweizen) zeigten die vier untersuchten *F. graminearum*-Isolate einen reproduzierbaren zeitlichen Verlauf des Befalls und des DON-Gehalts. Eine in der Literatur dokumentierte Abnahme des DON-Gehalts in den letzten Wochen vor der Ernte konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es traten signifikante Unterschiede zwischen einem Isolat (schwächere Aggressivität, geringere DON-Bildung) und den drei anderen Isolaten auf. In diesem *in vivo*-System korrelierten die Parameter DON-Bildung und Aggressivität signifikant miteinander. Der Verlauf der Regressions-Geraden spricht dafür, dass neben DON auch noch andere Faktoren zur Aggressivität von *F. graminearum* beitragen müssen. Offensichtlich ist DON ein Aggressivitätsfaktor für *F. graminearum*. Vor allem die Aus-

breitung im Wirt scheint durch DON gefördert zu werden. Es wird eine Nomenklatur der Aggressivitätsfaktoren analog zu der der Resistenz-Faktoren vorgeschlagen (Aggressivitätsfaktor Typ I = Primäre Infektion, Typ II = Ausbreitung im Wirt).

6. Die Korrelation zwischen DON-Gehalt und Aggressivität war über den Zeitraum der Pathogenese zwar zu verschiedenen Zeitpunkten von unterschiedlicher Qualität, aber für keinen Zeitpunkt konnte ein reproduzierbares Maximum nachgewiesen werden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war die Zeit von 21 dpi bis 35 dpi am günstigsten für eine Korrelation dieser beiden Parameter. In keinem der Versuche war zum Zeitpunkt der Ernte oder drei Wochen davor der günstigste Zeitpunkt. Ein weiterführender Schritt könnte eine Analyse früherer Infektionsstadien nach Einzelährchen-Inokulation unter Einsatz empfindlicherer Analysentechnik sein.

7. Die Ernte-Ergebnisse eines Inokulations-Versuchs zeigen, dass in den Körnern signifikant weniger DON enthalten ist als in den Spelzen oder der Spindel. Die Korrelation vom DON-Gehalt der Körner zum Anteil stark befallener Körner war enger als zur Befallshäufigkeit oder Fläche unter der Befallskurve. Die Ertrags-Parameter (Kornmasse pro Ähre) zeigten eine relativ enge signifikante Korrelation zu den Befallsparametern, so dass der Ertrag als zuverlässiger und zugleich mit relativ geringem Aufwand zu bestimmender Parameter für die Aggressivität dienen könnte.

8. Ein Vergleich zweier Sommerweizen-Sorten unterschiedlicher Resistenz gegenüber Ährenfusariosen ergab bei einer Ähren-Inokulation signifikante Unterschiede im Verlauf des Befalls und des DON-Gehalts. Die Unterschiede zwischen den beiden Isolaten zeigten eine vergleichbare Charakteristik wie die Unterschiede zwischen *Fusarium*-Isolaten verschiedener Aggressivität und DON-Bildung. Einige Ergebnisse weisen auf den in der Literatur beschriebenen DON-Metabolismus in der resistenten Sorte Frontana hin.

6. Summary

Fusarium head blight is still one of the most important cereal diseases, especially due to the contamination of feed and food with mycotoxins. In order to improve old ways or find new ways of disease management, detailed information about the complex interactions in host pathogen relationship is needed.

The aim of this work was to contribute to a better understanding of the role of mycotoxins, especially deoxynivalenol (DON), in the host pathogen system. To achieve this, at first a RP-HPLC method of analyzing the trichothecenes (type B) was evaluated and established in our institute.

The qualitative and quantitative potential of 47 *Fusarium* isolates to produce mycotoxins was tested *in vitro* and their taxonomic identification was verified by PCR. In addition, their aggressiveness was examined by means of a bioassay with young wheat plants which was performed close to natural conditions. A correlation between toxin production *in vitro* and aggressiveness could be a hint for the importance of DON in the host-pathogen relation.

For a smaller number of isolates the results were verified by inoculating spring wheat heads under controlled conditions. Another important aim was to investigate and compare the dynamics of symptom development and DON production of different isolates during pathogenesis. Moreover, it should be examined whether the correlation between DON content and aggressiveness was time-dependent. In this case, there would be a special point of time in pathogenesis with an especially close relationship between these two parameters, which indicates a great importance of DON. Such a comparison between different isolates is not known from literature yet. In another experiment, two wheat varieties of different resistance levels were tested.

1. A method of analyzing the type B trichothecenes with water/methanol extraction, cleanup by Extrelut NT3 columns, and RP-HPLC (UV detection at 220 nm) was established at our institute. In addition to the four trichothecenes DON, ADON, NIV, and ANIV, the much more apolar zearalenone could be detected within the same run. With a detection limit of 0,1 to 0,5 ppm, this method is in the range of comparable procedures. For a more sensitive method, it is recommended to use mycosep columns for cleanup and to combine HPLC with post-column derivatisation methods for trichothecenes.

2. The results of the morphological and PCR-based taxonomy methods showed a very high agreement. Thirty-eight pure *F. graminearum* isolates and one pure *F. culmorum* isolate were

identified. Moreover, eight isolates represented mixtures of *F. graminearum* (in five cases the dominant species) and *F. culmorum*. One of these isolates was a *F. avenaceum* isolate contaminated with *F. graminearum*.

3. Toxin production *in vitro* showed a typical time course with ADON being the dominant trichothecene in the beginning and DON thereafter. Moreover, distinct chemotypes were observed. Forty-three of the 47 isolates belonged to the DON chemotype and three to the NIV chemotype. Only in one isolate (*F. avenaceum* contaminated with *F. graminearum*), no B-type trichothecenes could be detected. No clear evidence for any NIV production by a DON chemotype or vice versa could be found. In addition to these qualitative differences, a significant quantitative variation between the isolates was observed. A significant correlation existed between DON and ADON, but not between zearalenone and any of the trichothecenes.

4. The isolates varied significantly in their aggressiveness against young wheat plants as well, but no significant correlation between the aggressiveness and the toxin production *in vitro* could be found. It is very likely that a significant correlation will be found when aggressiveness and toxin production are tested in the same system.

5. In the ear inoculation experiments, the time course of disease symptoms and DON content for the four isolates tested was reproducible. A decline in the DON content at the end of pathogenesis could not be clearly indicated in this study. There were significant differences between one isolate (less aggressiveness, lower toxigenicity) and the three others. In this *in vivo* system, significant correlations existed between DON content and aggressiveness. The graph of the linear regression indicates that DON is an aggressiveness factor for *F. graminearum* and that other factors, which contribute to the complex trait of aggressiveness, must exist. DON seems to be especially important for the spread of the pathogen within the host tissue. A nomenclature for aggressiveness factors in analogy with the resistance factors' nomenclature is proposed (aggressiveness factor type I = primary infection, aggressiveness factor type II = spread in the host tissue).

6. In spite of differences during the time course of pathogenesis, the quality of the correlation between aggressiveness and DON content does not show a reproducible maximum at any point of time. Under the given conditions, the closest relationship existed from 21 to 35 dpi. In none of the experiments, the correlation was best at harvest time. A recommendation for further investigations could be to analyse very early stages of infection after single spikelet inoculation with more sensitive analytical equipment.

7. The results of one harvest indicate that there is significantly more DON in the glumes and in the rachis than in grain. There was a closer relationship between the DON content of grain and the rate of heavily infected seeds than to the disease incidence of the spikelets or the area under the disease progress curve. The yield parameter, total grain mass per ear, had a very close significant relationship to the parameters reporting the disease symptoms, so that the yield could be used as a reliable and easily assessable parameter for the aggressiveness of a *F. graminearum* isolate.

8. In a comparison between two spring wheat varieties which differ in resistance against *Fusarium* head blight, there was a significant difference in time course of both disease incidence of the spikelets and DON content. The differences between the two varieties had a similar characteristic as the differences between the isolates of different aggressiveness and DON production. Some minor results seem to verify a metabolism of DON in the host plant as described in literature.

7. Literatur

- ADAMS-GC, HART-LP.** 1989. The role of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol in pathogenesis by *Gibberella zeae*, as elucidated through protoplast fusions between toxigenic and nontoxigenic strains. *Phytopathology* 79: 404-408
- ALTOMARE-C, PETRINI-O, LOGRIECO-A, BOTTALICO-A.** 1997. Taxonomic relationships among the toxigenic species *Fusarium acuminatum*, *Fusarium sporotrichioides*, and *Fusarium tricinctum* by isozyme analysis and RAPD assay. *Canadian Journal of Botany* 75: 10, 1674-1684
- ALTPETER-F, POSSELT-UK.** 1994. Production of high quantities of 3-acetyldeoxynivalenol and deoxynivalenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 384-387
- ANONYMOUS.** 1986. High performance liquid chromatographic analysis, reference data. In: systematic identification of mycotoxins. B.5. Identification of selected trichothecenes, aflatoxins and related mycotoxins, Helsinki 1986, ISBN 951-46-9465-1, pp 21-46
- ARSENIUK-E, FOREMSKA-E, GORAL-T, CHELKOWSKI-J.** 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology* 147, 577-590
- ATANASSOV-Z, NAKAMURA-C, MORI-N, KANEDA-C, KATO-H, JIN-Y-Z, YOSHIZAWA-T, MURAI-K.** 1994. Mycotoxin production and pathogenicity of *Fusarium* species and wheat resistance to *Fusarium* head blight. *Canadian Journal of Botany* 72: 161-167
- AWUAH-RT, LORBEER-JW.** 1988. Nature of cultural variability in *Fusarium oxysporum f.sp. apii* race 2. *Phytopathology* 78: 4, 385-389
- AWUAH-RT, LORBEER-JW.** 1989. Role of light, temperature, and method of propagation in cultural variability of *Fusarium oxysporum f.sp. apii* race 2. *Mycologia* 81: 2, 278-283
- BAI-GH, DESJARDINS-AE, PLATTNER-RD.** 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 2, 91-98
- BALDWIN-NCP, BYCROFT-BW, DEWICK-PM, GILBERT-J, HOLDEN-I.** 1985. Biosynthesis of trichothecene mycotoxins in *Fusarium culmorum* cultures. *Zeitschrift für Naturforschung* 40c: 514-518
- BARTELS-M.** 1998. Ährenfusariosen - Die unterschätzte Gefahr ? *Top Agrar* 12/98 : 62-65

- BEDI-JS.** 1994. Further studies on control of sunflower broomrape with *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* - a potential mycoherbicide. In: Pieterse-AH, Verkleij-JAC, Borg-SJ (eds.): Biology and management of *Orobanche*. Proceedings of the third international workshop on *Orobanche* and related *Striga* research, Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993. 1994. pp. 539-544. NUGI 835
- BINDER-J, HORVATH-EM, SCHATZMAYR-G, ELLEND-N, DANNER-H, KRŠKA-R, BRAUN-R.** 1997. Screening for deoxynivalenol-detoxifying anaerobic rumen microorganisms. Cereal Research communications 25 (3 Part 1): 343-346
- BOOTH-C.** 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, SBN 85198-046-5
- BOTTALICO-A, LOGRIECO-A, VISCONTI-A.** 1989. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. Mycopathologia 107: 2-3: 85-92
- BOTTALICO-A, PERRONE-G.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology 108: 611-624
- BROWN-DW, MCCORMICK-SP, ALEXANDER-NJ, PROCTOR-RH, DESJARDINS-AE.** 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology 32, 121-133
- BRUINS-MBM, KARSAI-I, SCHEPERS-J, SNIJDERS-CHA.** 1993. Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to in vitro selection for *Fusarium* head blight resistance. Plant Science 94: 195-206
- BURGESS-LW, SUMMERELL-BA, BULLOCK-S, GOTT-KP, BACKHOUSE-D.** 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd Edition, *Fusarium* research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia; ISBN 0-86758-849-7
- CHANG-HL, DEVRIES-JW, LARSON-PA, PATEL-HH.** 1984. Rapid determination of deoxynivalenol (Vomitoxin) by liquid chromatography using modified Romer column cleanup. Journal of the AOAC 67: 1, 52-54
- CHELKOWSKI-J, BATEMAN-GL, MIROCHA-CJ.** 1999. Identification of toxigenic *Fusarium* species using PCR assays. Journal of Phytopathology 147: 5, 307-311
- CHELKOWSKI-J, MANKA-M.** 1983. The ability of *Fusaria* pathogenic to wheat, barley and corn to produce zearalenone. Phytopathologische Zeitschrift 106: 354-359
- CHEN-LF, SONG-YL, XU-YG.** 1996. Variation in the concentrations of deoxynivalenol in the spikes of winter wheat infected by *Fusarium graminearum* Schw.. Acta Phytopathologica Sinica 26: 1, 25-28

- COLE-RJ, COX-RH.** 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York
- COONEY-JM, LAUREN-DR, DI MENNA-ME.** 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 522-526
- CUNDLIFFE-E, CANNON-M, DAVIES-J.** 1974. Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA 71: 30 ff
- DESJARDINS-AE, BAI-G-H, PLATTNER-RD, PROCTOR-RH.** 2000. Analysis of aberrant virulence of *Gibberella zea* following transformation-mediated complementation of a trichothecene-deficient (Tri5) mutant. Microbiology 146: 2059-2068
- DESJARDINS-AE, HOHN-TM, MCCORMICK-SP.** 1992. Effect of gene disruption of trichodiene synthase on the virulence of *Gibberella pulicaris*. Molecular Plant- Microbe Interaction 5: 214-222
- DESJARDINS-AE, PROCTOR-RH, BAI-G, MC CORMICK-SP, SHANER-G, BUECHLEY-G, HOHN-TM.** 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. Molecular Plant Microbe Interactions 9: 9, 775-781
- DESJARDINS-AE, SPENCER-GF, PLATTNER-RD, BEREMAND-MN.** 1989. Furanocoumarin Phytoalexins, trichothecene toxins, and infection of *Pastinaca sativa* by *Fusarium sporotrichioides*. Phytopathology 79: 2, 170-175
- DOOHAN-FM, PARRY-DW, JENKINSON-P, NICHOLSON-P.** 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. Plant Pathology 47, 197-205
- DOOHAN-FM, PARRY-DW, NICHOLSON-P.** 1999. *Fusarium* ear blight of wheat: the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. Plant Pathology 48: 209-217
- DUNCAN-JS, BU'LOCK-JD.** 1985. Degeneration of zearalenone production in *Fusarium graminearum*. Experimental Mycology 9: 2, 133-140
- ENGELHARDT-G, SCHUSTER-M, LEPSCHY-J, WALLNÖFER-PR.** 1986. Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in Germany. 1. Time course of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone formation on solid substrates. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 182: 123-1261
- EUDES-F, COMEAU-A, RIOUX-S, COLLIN-J.** 2001. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). Canadian Journal of Plant Pathology, 23: 318-322

- EVANS-CK, XIE-W, DILL-MACKY-R, MIROCHA-CJ.** 2000. Biosynthesis of deoxynivalenol in spikelets of barley inoculated with macroconidia of *Fusarium graminearum*. Plant Disease 84: 6, 654-660
- FEINBERG-B, MCLAUGHLIN-CS.** 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley-VR (Ed), Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiologic effects Vol. 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, chapter 2, pp.27-35
- GAMS-W.** 1989. Taxonomy and nomenclature of *Microdochium nivale* (*Fusarium nivale*). In: Celkowski-J (ed) *Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* (pp 195-198) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- GANG-G, MIEDANER-T, SCHUHMACHER-U, SCHOLLENBERGER-M, GEIGER-HH.** 1998. Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. Phytopathology 88: 879-884
- GAREIS-M, CEYNOWA-J.** 1994. Einfluß des Fungicids Matador (Tebuconazole/Triadimenol) auf die Mykotoxinbildung durch *Fusarium culmorum*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 198: 244-248
- GERLACH-W, NIRENBERG-H.** 1982. The genus *Fusarium*- a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin Dahlem 209: 1-406
- GILBERT-J, ABRAMSON-D, MCCALLUM-B, CLEAR-R.** 2001. Comparision of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. Mycopathologia 153: 209-215
- GILBERT-J, TEKAUZ-A.** 2000. Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 22: 1-8
- GOTTWALD-S, GERMEIER-CU, RUHMANN-W.** 2001. Computerized image analysis in *Fusarium* taxonomy. Mycological Research 105: 2, 206-214
- GREENHALGH-R, LEVANDIER-D, ADAMS-W, MILLER-JD, BLACKWELL-BA, MCALEES-AJ, TAYLOR-A.** 1986. Production and characterization of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *Fusarium culmorum* (CMI 14764, HLX 1503). Journal of Agricultural and Food Chemistry 34: 98-102
- GREENHALGH-R, NEISH-GA, MILLER-JD.** 1983. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. Applied and Environmental Microbiology 46: 3, 625-629

- GUTLEB-AC, MORRISON-E, MURK-AJ.** 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 309-320
- HARRIS-LJ, DESJARDINS-AE, PLATTNER-RD, NICHOLSON-P, BUTLER-G, YOUNG-JC, WESTON-G, PROCTOR-RH, HOHN-TM.** 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* in maize. *Plant Disease* 83: 954-960
- HARRIS-LJ, GLEDDIE-SC.** 2001. A modified Rpl3 gene from rice confers tolerance of the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol to transgenic tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 173-181
- HESTBJERG-H, FELDING-G, ELMHOLT-S.** 2002. *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology* 150: 308-312
- HOMDORK-S, FEHRMANN-H, BECK-R.** 2000. Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat-grain. *Journal of Phytopathology* 148: 7-15
- HOMDORK-S.** 1996. Influence of field application of tebuconazole and different storage conditions on the mycotoxin content and other characteristics of *Fusarium* infected wheat grain. Dissertation, Göttingen, Mai 1996, Cuvillier-Verlag, pp. 12-17, 82-99 ISBN 3-89588-601-7, Göttingen, Germany
- ICHINOE-M, KURATA-H.** 1983. Trichothecene-producing fungi. In: Y.Ueno (Ed), *Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects* (Developments in Food Science, Vol.4), Kodansha LTD., Elsevier, Amsterdam, pp
- JOSEPHS-RD, SCHUHMACHER-R, KRŠKA-R.** 2001. International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. *Food Additives and Contaminants* 18: 5, 417-430
- KALE-S, BENNETT-JW.** 1992. Strain instability in filamentous fungi. In: D.Bhatnagar, E.B.Lillehoj, D.K.Arora (Eds), *Handbook of Applied Mycology Vol5: Mycotoxins in Ecological Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, chapter 12, pp311-331
- KAMIMURA-H.** 1989. Removal of mycotoxins during food processing. In: S.Natori, K.Hashimoto, Y.Ueno (Eds), *Mycotoxins and Phycotoxins '88. A collection of Invited Papers Presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan, 16.-19.August 1988*, © Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, pp 51-56, Tokyo, Japan
- KANG-Z, BUCHENAUER-H.** 1999. Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 275-288

- KANG-Z, BUCHENAUER-H.** 2000. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host response in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 6, 255-268
- KANG-Z, BUCHENAUER-H.** 2002. Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 108: 653-660
- KARLOVSKY-P.** 1999. Biological detoxification of Fungal Toxins and its Use in Plant Breeding, Feed and Food Production. *Natural Toxins* 7: 1-23
- KIMURA-M, MATSUMOTO-G, SHINGU-Y, YONEYAMA-K, YAMAGUCHI-I .** 1998. The mystery of the 3-O-acetyltransferase gene. Analysis of the region around Tri101 and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Letters* 435: 163-168
- KING-RR, MCQUEEN-RE, LEVESQUE-D, GREENHALGH-R.** 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 5, 1181-1183
- KNOLL-S, NIESSEN-L, VOGEL-RF.** 2000. Application of a PCR protocol for the diagnosis of trichothecene producing *Fusarium* species in deoxynivalenol contaminated wheat. *Mycotoxin Research* 16 A: 1, 241-243 (Proceedings of 22th Mykotoxin-Workshop 5-7 June 2000 Bonn, Germany, Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.)
- KOTAL-F, HOLADOVA-K, HAJŠLOVA-J, POUŠTKA-J, RADOVA-Z.** 1999. Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A* 830: 219-225
- KREUZ-K, TOMMASINI-R, MARTINOIA-E.** 1996. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology* 111: 349-353
- KRSKA-R, BAUMGARTNER-S, JOSEPHS-R.** 2001. The state-of-the-art in the analysis of type-A and type-B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371: 285-299
- KRSKA-R, JOSEPHS-R.** 2000. Analysis of deoxynivalenol and zearalenone: State-of-the-art in Europe. *Mycotoxin research* 16 A: 1, 213-216 (Proceedings of 22th Mykotoxin-Workshop 5-7 June 2000 Bonn, Germany, Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.)
- KRSKA-R, JOSEPHS-R.** 2001. The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369: 469-476
- LACEY-J, BATEMAN-GL, MIROCHA-CJ.** 1999. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* species in wheat. *Annals of Applied Biology* 134: 277-283

- LANGSETH-W, BERNHOFT-A, RUNDBERGET-T, BREKKE-T, KOSIAK-B, GAREIS-M.** 1997. Cytotoxicity and mycotoxin production of *Fusarium* strains isolated from Norwegian grain. Cereal Research communications 25 (3 Part 1): 419-421
- LANGSETH-W, GHEMBREMESKEL-M, KOSIAK-B, KOLSAKER-P, MILLER-D.** 2000. Production of culmorin compounds and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* strains isolated from Norwegian cereals. Mycopathologia 152: 1, 23-34
- LANIN-SN, PETRENKO-VV, LEONOV-AN, KONONENKO-GP, SOBOLEVA-NA.** 1990. Selective binary mobile phase for high-performance liquid chromatography of 12,13-epoxytrichothec- 9-en-8-ones. Chemistry of Natural Compounds 25: 6, 732-734
- LAUBER-U.** 1999. persönliche Mitteilung auf dem 21. Mykotoxin-Workshop Jena, 7.-9. Juni 1999, Gesellschaft für Mykotoxinforschung e. V. und in 6/99 und 7/99
- LAUREN-DR, SAYER-ST, DI MENNA-ME.** 1992. Trichothecene production by *Fusarium* species isolated from grain and pasture throughout New Zealand. Mycopathologia 120: 167-176
- LEES-A.** 1995. Diagnosis and Control of Foot Rot Pathogens of Wheat. Buckinghamshire, UK: Open University, PhD thesis
- LEE-T, HAN-Y-K, KIM-K-H, LEE-Y-W.** 2002. Tri13 and Tri7 determine deoxinivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. Applied and Environmental Microbiology 68: 5, 2148-2154
- LEE-T, OH-DW, KIM-HS, LEE-J, KIM-JH, YUN-SH, LEE-YW.** 2001. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. Applied and Environmental Microbiology 67: 7, 2966-2972
- LEMMENS-M, JOSEPHS-R, SCHUHMACHER-R, GRAUSGRUBER-H, BUERSTMAYR-H, RUCKENBAUER-P, NEUHOLD-G, FIDESSER-M, KRKA-R.** 1997. Head blight (*Fusarium* spp.) on wheat: Investigations on the relationship between disease symptoms and mycotoxin content. Cereal Research Communications 25 (3 Part 1): 459-465
- LEPSCHY-J.** 1998. Persönliche Schriftliche Mitteilung bei Überstellung mehrerer *Fusarium*-Isolate.
- LEPSCHY-J.** 1999. 21. Mykotoxin-Workshop 7.-9-Juni 1999. Persönliche Mitteilung.
- LEPSCHY-J.** 2000. Nachweis eines Pilztoxins (Deoxynivalenol) mittels HPLC und Nachsäulenderivatisierung. GIT Labor-Fachzeitschrift 3/2000: 275-277

- LIN-YS, WANG-PH, LO-CT.** 1988. Variation and survival of *Fusarium oxysporum f.sp. pisi* race 2. Plant Protection Bulletin Taiwan 30: 1, 15-23
- LIU-W, LANGSETH-W, SKINNES-H, ELEN-ON, SUNDHEIM-L.** 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology 103: 589-595
- LLORENZ-A, MATEO-R, MATEO-JJ, JIMENEZ-M.** 2002. Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. Food Additives and Contaminants 19: 3, 272-281
- LOGRIECO-A, MANKA-M, ALTOMARE-C, BOTTALICO-A.** 1990. Pathogenicity of *Fusarium graminearum* chemotypes towards corn, wheat, triticale and rye. Journal of Phytopathology 130: 197-204
- MACRI-F, VIANELLO-A, BRAIDOT-E, PETRUSSA-E, MOKHOVA-EN.** 1996. Zearalenone-induced uncoupling in plant mitochondria is sensitive to 6-Ketocholestanol. Biochemistry and Molecular Biology International 39: 5, 1001-1006
- MAGAN-N, HOPE-R, COLLEATE-A, BAXTER-ES.** 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. European Journal of Plant Pathology 108: 685-690
- MAIER-FJ, OETTLER-G.** 1996. Genetic variation for head blight resistance in triticale caused by *Fusarium graminearum* isolates of different deoxynivalenol production. Euphytica 89: 387-394
- MANKA-M, VISCONTI-A, CHELKOWSKI-J, BOTTALICO-A.** 1985. Pathogenicity of *Fusarium* isolates from wheat, rye and triticale towards seedlings and their ability to produce trichothecenes and zearalenone. Phytopathologische Zeitschrift 113: 24-29
- MATEO-JJ, LLORENS-A, MATEO-R, JIMENEZ-M.** 2001. Critical study of and improvement in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. Journal of Chromatography A 918: 99-112
- MATTHIES-A, MENCK-BH, BLEIHOLDER-H.** 2000. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Strobilurinhaltigen Fungiziden im Vergleich zu Azolen auf den Gehalt an Deoxynivalenol (DON) in Weizenproben des Erntejahres 1999- Erste Erkenntnisse - (A comparative study into the effects of strobilurin containing and azole fungicides on the content of deoxynivalenol (DON) in wheat samples of 1999 - Initial results -). Gesunde Pflanzen 52: 1, 26-32

- MAYCOCK-R, UTLEY-D.** 1985. Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 347: 429-433
- MCKEEHEN-JD, BUSCH-RH, FULCHER-RG.** 1999. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1476-1482
- MCLEAN-M.** 1996a. The phytotoxicity of selected mycotoxins on mature, germinating *Zea mays* embryos. *Mycopathologia* 132: 173-183
- MCLEAN-M.** 1996b. The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: An update since 1989. *Mycopathologia* 133: 3, 163-179
- MESTERHAZY-A, BARTOK-T.** 1993. Resistance and pathogenicity influencing toxin (DON) contamination of wheat varieties following *Fusarium* infection. *Hodowla-Roslin,-Aklimatyzacja-i-Nasiennictwo* 1993, 37: 3, 9-15
- MESTERHAZY-A, BARTOK-T.** 1997. Effect of chemical control on FHB and toxin contamination of wheat. *Cereal Research Communications* 25: 3 Part 2, 781-783
- MESTERHAZY-A.** 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386
- MESTERHAZY-A.** 2000. Latest results of breeding wheat cultivars resistant to FHB in Hungary. 6th European *Fusarium* seminar 11.-16-09-2000, Berlin. Book of Abstracts: Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 377: 35
- MESTERHAZY-A.** 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108: 675-684
- MIEDANER-T, GANG-G, SCHILLING-AG, GEIGER-HH.** 1997. Aggressiveness and mycotoxin production of populations of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in winter rye. *Cereal Research Communications* 25 (3 Part 1): 471-475
- MIEDANER-T, PERKOWSKI-J.** 1996. Correlations among *Fusarium culmorum* head blight resistance, fungal colonization and mycotoxin contents in winter rye. *Plant Breeding* 115: 347-351
- MIEDANER-T, REINBRECHT-C, LAUBER-U, SCHOLLENBERGER-M, GEIGER-HH.** 2001. Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breeding* 120, 97-105

- MIEDANER-T, REINBRECHT-C, SCHILLING-AG.** 2000. Association among aggressiveness, fungal colonisation, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 107: 2, 124-134
- MIEDANER-T, SCHILLING-AG.** 1996. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. European Journal of Plant Pathology 102: 823-830
- MIEDANER-T.** 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. Plant Breeding 116: 201-220
- MILLER-JD, ARNISON-PG.** 1986. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. Canadian Journal of Plant Pathology 8: 147-150
- MILLER-JD, EWEN-MA.** 1997. Toxic effects of deoxynivalenol on ribosomes and tissues of the spring wheat cultivars Frontana and Casavant. Natural Toxins 5: 234-237
- MILLER-JD, GREENHALGH-R, WANG-Y, LU-M.** 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. Mycologia 83: 2, 121-130
- MILLER-JD, MACKENZIE-S.** 2000. Secondary metabolites of *Fusarium venenatum* strains with deletions in the Tri5 gene encoding trichodiene synthetase. Mycologia 92: 4, 764-771
- MILLER-JD, TAYLOR-A, GREENHALGH-R.** 1983a. Production of Deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Microbiology 29: 1171-1178
- MILLER-JD, YOUNG-JC, SAMPSON-DR.** 1985. Deoxynivalenol and *Fusarium* Head Blight resistance in Spring Cereals. Phytopathologische Zeitschrift 113: 359-367
- MILLER-JD, YOUNG-JC, TRENHOLM-HL.** 1983b. *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins
- MILLER-JD, YOUNG-JC.** 1985. Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. Canadian Journal of Plant Pathology 7: 132-134
- MIROCHA-CJ, YU, HUI, EVANS-CK, KOLACZKOWSKI-EK, DILLMACKY-R.** 1997. Chemistry and physiology of deoxynivalenol in pathogenesis. Cereal Research communications 25 (3 Part 1): 309-313

- MIROCHA-CJ, XIE-W, XU-Y, WILCOXSON-RD, WOODWARD-RP, ETEBARIAN-RH, BEHELE-G.** 1994. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* on barley and wheat. *Mycopathologia* 128: 19-23
- MIROCHA-CJ.** 1983. Effect of Trichothecene Mycotoxins on Farm Animals. In: Y.Ueno (Ed), *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects (Developments in Food Science, Vol.4)*, Kodansha LTD., Elsevier, Amsterdam, pp. 177-194
- MITCHELL-RE.** 1984. The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 22: 215-245
- MORARU-I, ITTU-M, CIOCAZAN-I.** 1997. In vitro response to *Fusarium* toxin (ZEN) of some winter wheat and maize genotypes. *Cereal Research Communications* 25: 3 Part 1, 503-505
- MUTHOMI-JW, OERKE-E-C, DEHNE-H-W, MUTITU-EW.** 2002b. Susceptibility of kenian wheat varieties to head blight, fungal invasion and deoxynivalenol accumulation inoculated with *Fusarium graminearum*. *Journal of Phytopathology* 150: 30-36
- MUTHOMI-JW, OERKE-EC, MUTITU-EW, SCHADE-SCHUETZE-A, DEHNE-HW.** 2002a. Variation among *Fusarium* species and isolates infecting wheat ears based on aggressiveness, mycotoxin production and RAPD-PCR analysis. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 109: 5, 462-477
- MUTHOMI-JW, SCHÜTZE-A, DEHNE-H-W, MUTITU-EW, OERKE-E-C.** 2000. Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 107: 2, 113-123
- NELSON-PE, TOUSSOUN-TA, MARASAS-FO.** 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania State University Press, USA, ISBN 0-271-00349-9
- NICHOLSON-P, SIMPSON-DR, WESTON-G, REZANOOR-HN, LEES-AK, PARRY-DW, JOYCE-D.** 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 17-37
- NIRENBERG-H.** 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany* 59: 1599-1609
- NIRENBERG-HI.** 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* 127: 1-93

- O'DONNELL-K, CIGELNIK-E, CASPER-HH.** 1998. Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. Fungal Genetics and Biology 23: 1, 57-67
- OKUBARA-PA, BLECHL-AE, MCCORMICK-SP, ALEXANDER-MJ, DILL-MACKY-R, HOHN-TM.** 2002. Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. Theoretical and Applied Genetics, Online-Publikation, DOI 10.1007/s00122-002-1066-2, veröffentlicht 19.09.2002, <http://link.springer.de/link/service/journals/00122/contents/02/01066/>, 23.11.2002
- OLSEN-M.** 1989. Metabolism of Zearalenon in Farm Animals. In: J. Chelkowski (Ed), *Fusarium-mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* (Topics in Secondary Metabolism, Vol. 2), Elsevier, Amsterdam, pp. 167-177
- OSWALD-JW.** 1949. Cultural variation, taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* species associated with cereal root rots. Phytopathology 39: 359-376
- PACKA-D.** 1991. Cytogenetic changes in plant cells as influenced by mycotoxins. Mycotoxin Research 7: A (Suppl.) Part II, 150-155
- PARRY-DW, JENKINSON-P, MCLEOD-L.** 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathology 44: 207-238
- PARRY-DW, NICHOLSON-P.** 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology 45: 383-391
- PERKOWSKI-J, KIECANA-I, SCHUMACHER-U, MULLER-HM, CHELKOWSKI-J, GOLINSKI-P.** 1997. Head infection and accumulation of *Fusarium* toxins in kernels of 12 barley genotypes inoculated with *Fusarium graminearum* isolates of two chemotypes. European Journal of Plant Pathology 103: 1, 85-90
- PERKOWSKI-J.** 1998. Distribution of deoxynivalenol in barley kernels infeced by *Fusarium*. Nahrung 42: 2, 81-83
- PINEIRO-MS, SCOTT-PM, KANHERE-SR.** 1996. Mycotoxin producing potential of *Fusarium graminearum* isolates from Uruguayan barley. Mycopathologia 132: 3, 167-172
- PIRGOZLIEV-SR, EDWARDS-SG, HARE-MC, JENKINSON-P.** 2002. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. European Journal of Plant Pathology 108: 469-478

- PRITSCH-C, MUEHLBAUER-GJ, BUSHNELL-WR, SOMERS-DA, VANCE-CP.** 2000. Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 2, 159-169
- PRITSCH-C, VANCE-CP, BUSHNELL-WR, SOMERS-DA, HOHN-TM, MUEHLBAUER-GJ.** 2001. Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 1-12
- PROCTOR-RH, DESJARDINS-AE, MCCORMICK-SP, PLATTNER-RD, ALEXANDER-NJ, BROWN-DW.** 2002. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 691-698
- PROCTOR-RH, HOHN-TM, MCCORMICK-SP.** 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 4, 593-601
- PROM-LK, HORSLEY-RD, STEFFENSON-BJ, SCHWARZ-PB.** 1999. Development of *Fusarium* head blight and accumulation of deoxynivalenol in barley sampled at different growth stages. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57: 2, 60-63
- RADOVA-Z, HOLADOVA-K, HAJŠLOVA-J.** 1998. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *Journal of Chromatography A*, 829, 259-267
- RAHMAN-MF, BILGRAMI-KS, MASOOD-A.** 1993. Cytotoxic effects of DON and T-2 toxin on plant cells. *Mycopathologia* 124: 95-97
- REID-LM, MATHER-DE, HAMILTON-RI.** 1996. Distribution of deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*-infected maize ears. *Phytopathology* 86: 110-114
- REID-LM, NICOL-RW, OUELLET-T, SAVARD-M, MILLER-JD, YOUNG-JC, STEWART-DW, SCHAAFSMA-AW.** 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 89: 1028-1037
- RIBICHICH-KF, LOPEZ-SE, VEGETTI-AC.** 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease* 84: 7, 794-802
- ROTTER-B, THOMPSON-BK, CLARKIN-S, OWEN-TC.** 1993. Rapid colorimetric bioassay for screening of *Fusarium* mycotoxins. *Natural Toxicology* 1: 303-307
- RUDOLPH-K.** 1976. Non-specific toxins. In: R.Heitefuss, P.H.Williams (Eds), *Physiological Plant Pathology (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol.4)*, Springer-Verlag, Berlin, pp.270-315

- RYU-D, BULLERMAN-LB.** 1999. Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *Journal of Food Protection* 62: 12, 1451-1455
- SANDERMANN-H JR..** 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS (Trends in Biochemical Science)* 17: 82-84
- SANO-A, MATSUTANI-S, SUZUKI-M, TAKITANI-S.** 1987. High-performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography* 410: 427-436
- SAVARD-ME, SINHA-RC, SEAMAN-WL, FEDAK-G.** 2000. Sequential distribution of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat spikes after inoculation with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 280-285
- SCHAAFSMA-AW, TAMBURIC-ILLINIC-L, MILLER-JD, HOOKER-DC.** 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 279-285
- SCHILLING-A.** 1996. Characterization and differentiation of the cereal pathogen *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* by PCR-based molecular markers. *Dissertationsschrift*. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart, Germany
- SCHNEIDER-R.** 1958. Untersuchungen über Variabilität und Taxonomie von *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc.. *Phytopathologische Zeitschrift* 32: 1, 95-126
- SCHNERR-H, VOGEL-RF, NIESSEN-L.** 2002. Correlation between DNA of trichothene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology* 35: 2, 121-125
- SCHROEDER-HW, CHRISTENSEN-JJ.** 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838
- SCHUHMACHER-R, KRSKA-R, GRASSERBAUER-M, EDINGER-W, LEW-H.** 1998. Immuno-affinity columns versus conventional clean-up: a method-comparison study for the determination of zearalenon in corn. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 360: 2, 241-245
- SCHUHMACHER-R, KRSKA-R, WEINGÄRTNER-J, GRASSERBAUER-M.** 1997. Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359: 510-515

- SCHUSTER-M, LEPSCHY-J, BIBER-A, ENGELHARDT-G, WALLNÖFER-PR.** 1987. Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in Germany. 2. Time course of deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol formation by *Fusarium graminearum* in different liquid media. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung 185: 477-480
- SCHUSTER-M.** 1988. Analytik und Vorkommen ausgewählter Fusarientoxine sowie Bildung und Abbau von [¹⁴C] Deoxynivalenol. Dissertation, Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät Chemie und Pharmazie
- SCHWEDT-G.** 1981. Fluorimetrische Analyse - Methoden und Anwendungen. Seite 6. Verlag Chemie, Weinheim.
- SCOTT-PM, NELSON-K, KANHERE-SR, KARPINSKI-KF, HAYWARD-S, NEISH-GA, TEICH-AH.** 1984. Decline in deoxynivalenol (Vomitoxin) concentrations in 1983 Ontario winter wheat before harvest. Applied and Environmental Microbiology 48: 4, 884-886
- SEITZ-LM, SAUER-DB, BURROUGHS-R, MOHR-HE, HUBBARD-JD.** 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. Phytopathology 69: 1202-1203
- SEO-JA, KIM-JC, LEE-DH, LEE-YW.** 1996. Variation in 8-ketotrichothecenes and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates from corn and barley in Korea. Mycopathologia 134: 1, 31-37
- SEWALD-N, LEPSCHY VON GLEISSENTHALL-J, SCHUSTER-M, MÜLLER-G, APLINE-RT.** 1992. Structure elucidation of a plant metabolite of 4-Desoxynivalenol. Tetrahedron: Asymmetry 3: 7, 953-960
- SHARMA-R.** 1993. Immunotoxicity of mycotoxins. Journal-of-Dairy-Science 76: 3, 892-897
- SHEPHERD-MJ, GILBERT-J.** 1988. Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 36: 305-308
- SHIMADA-T, OTANI-M.** 1990. Effects of *Fusarium* mycotoxins on the growth of shoots and roots at germination in some Japanese wheat cultivars. Cereal Research Communications 18: 3, 229-232
- SIDOROV-IA, ESAULENKO-EA, ANPILOGOVA-LK, SOKOLOV-MS.** 1998. Comparative characterization of the harmful effects of various forms of *Fusarium* head blight pathogens. Agrokhimiya 0: 5, 86-90
- SINGH-RP, MA-H, RAJARAM-S.** 1995. Genetic Analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. Plant Disease 79: 3, 238-240

- SINHA-RC, SAVARD-ME.** 1997. Concentration of deoxynivalenol in single kernels and various tissues of wheat heads. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 8-12
- SIRANIDOU-E, KANG-Z, BUCHENAUER-H.** 2002. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200-208
- SNIJDEERS-CHA, KRECHTING-CF.** 1992. Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat. *Canadian Journal of Botany* 70: 1570-1576
- SNIJDEERS-CHA, PERKOWSKI-J.** 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* 80: 566-570
- SNIJDEERS-CHA.** 1990. Aspekte der Resistenz gegen Partielle Taubährrigkeit, verursacht durch *Fusarium culmorum* bei Weizen. Arbeitstagung 1990 der "Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtler" innerhalb der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter, gehalten vom 20. bis 22. November 1990 an der Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, A-8952 Irdning, Seiten 235-238
- STACK-RW.** 1989. A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 137-142
- STOB-M, BALDWIN-RS, TUITE-J, ANDREWS-FN, GILLETTE-KG.** 1962. *Nature* 196: 1318 f
- STRATTON-GW, ROBINSON-AR, SMITH-HC, KITTILSEN-L, BARBOUR-M.** 1993. Levels of Five Mycotoxins in Grains Harvested in Atlantic Canada as Measured by High Performance Liquid Chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 399-409
- SUGIURA-Y, WATANABE-Y, TANAKA-T, YAMAMOTO-S, UENO-Y.** 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 10, 3047-3051
- SUNDHEIM-L, LANGSETH-W, ELEN-O, SKINNES-H, LIU-W.** 1997. Methods for assessment of resistance and deoxynivalenol production in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *Cereal Research Communications* 25 (3 Part 2): 689-691
- SUTTON-JC.** 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209
- SUTY-A, MAULER-MACHNIK-A.** 1996. New Findings on the epidemiology of *Fusarium* ear blight on wheat and its control with Tebuconazole. Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases - 1996. Volume 2. Proceedings of an International Conference, Brighton, UK, 18-21 November, 1996, 1996, 511-516, 11 ref, IB: 0-948404-99-X

- SUTY-A, MAULER-MACHNIK-A.** 1998. Ährenfusariosen an Weizen. *Getreide* 4: 3, 138-140
- SYDENHAM-EW, MARASAS-WFO, THIEL-PG, SHEPHARD-GS, NIEUWENHUIS-JJ.** 1991. Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. crookwellense* isolates. *Food Additives and Contaminants* 8: 1, 31-41
- TAJIMA-O, SCHOEN-ED, FERON-VJ, GROTEN-JP.** 2002. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food and Chemical Toxicology* 40: 685-695
- TEICH-AH.** 1989. Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* ssp. In: J. Chelkowski (Ed), *Fusarium- mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* (Topics in Secondary Metabolism, Vol. 2), Elsevier, Amsterdam, pp. 269-282
- TRENHOLM-HL, WARNER-RM, FITZPATRICK-DW.** 1984. Rapid, sensitive liquid chromatographic method for determination of zearalenone and α - and β -zearalenol in wheat. *Journal of the AOAC* 67: 5, 968-972
- TURNER-AS, LEES-AK, REZANOOR-HN, NICHOLSON-P.** 1998. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology* 47: 3, 278-288
- UENO-Y, SAWANO-M, ISHI-K.** 1975. Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology* 30: 4-9
- UENO-Y.** 1977. Mode of action of trichothecenes. *Pure and Applied Chemistry* 49: 1737-1745
- VISCONTI-A, BOTTALICO-A.** 1983. Detection of *Fusarium* trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenone and 3-acetyldeoxynivalenol) by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 17: 2, 97-100
- VISCONTI-A, MINERVINI-F, LUCIVERO-G, GAMBATESA-V .** 1991. Cytotoxic and immunotoxic effects of *Fusarium* mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia* 113: 181-186
- VUDATHALA-DK, PRELUSKY-DB, TRENHOLM-HL.** 1994. Analysis of trace levels of deoxynivalenol in cow's milk by high pressure liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 17: 3, 673-683
- VURRO-M, ELLIS-BE.** 1997. Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Science* 126: 29-38
- WAKULINSKI-W.** 1989. Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat heat fusariosis (head blight). *Acta Physiologiae Plantarum* 11: 4, 301-306

- WALKER-F, MEIER-B.** 1998. Determination of the *Fusarium* mycototins nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-O-acetyl-4-deoxynivalenol in contaminated whole wheat flour by liquid chromatography with diode array detection and gas-chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International* 81: 4, 741-748
- WALKER-SL, LEATH-S, HAGLER-WM-JR, MURPHY-JP.** 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with *Fusarium* head blight in North Carolina. *Plant Disease* 85: 4, 404-410
- WANG-YZ, MILLER-JD.** 1988. Effect of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Phytopathology* 122: 118-125
- WANYOIKE-MW, KANG-Z, BUCHENAUER-H.** 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 8, 803-810
- WEINGÄRTNER-J, KRSKA-R, PRAZNIK-W, GRASSERBAUER-M, LEW-H.** 1997. Use of Mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron-capture gas chromatography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357: 1206-1210
- WIDESTRAND-J, PETTERSSON-H.** 2001. Effects of time, temperature and solvent on the stability of T-2 Toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol and nivalenol calibrants. *Food Additives and Contaminants* 18: 11, 987-992
- WING-N, BURGESS-LW, BRYDEN-WL.** 1995. Cultural degeneration in two *Fusarium* species and its effects on toxigenicity and cultural morphology. *Mycological Research* 99: 5, 615-620
- WISNIEWSKA-H, CHELKOWSKI-J.** 1994. Influence of deoxynivalenol on mitosis of root tip cells of wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 16: 3, 159-162
- WOLF-CE, BULLERMAN-LB.** 1998. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment. *Journal of Food Protection* 61: 3, 365
- WONG-LSL, ABRAMSON-D, TAKAUZ-A, LEISLE-D, MCKENZIE-RIH.** 1995. Pathogenicity and mycotoxin production of *Fusarium* species causing head blight in wheat cultivars varying in resistance. *Canadian Journal of Plant Science* 75: 1, 261-267
- YAO-QH, LIU-ZZ, ZENG-YS.** 1996. Detoxification of deoxynivalenol by scab resistant wheat and the bioactivities of the product. *Acta Mycologica Sinica* 15: 1, 59-64
- YI-C, KAUL-H-P, KÜBLER-E, SCHWADORF-K, AUFHAMMER-W.** 2001. Head blight (*Fusarium graminearum*) and deoxynivalenol concentration in winter wheat as affected by pre-crop, soil-tillage and nitrogen fertilization. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108: 3, 217-230

-
- YLI-MATTILA-T, PAAVANEN-S, HANNUKALA-A, PARIKKA-P, TAHVONEN-R, KARJALAINEN-R.** 1996. Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. Plant Pathology 45: 126-134
- YODER-OC.** 1980. Toxins in pathogenesis. Annual Review of Phytopathology 18: 103-129
- YODER-WT, CHRISTIANSON-LM.** 1998. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Fungal genetics and Biology
- YOUNG-JC, GAMES-DE.** 1992. Supercritical fluid chromatography of *Fusarium* mycotoxins. Journal of Chromatography 627: 247-254

8. Anhang

A.1 Chemikalien

Tabelle A.1: Chemikalien für die Molekularbiologie:

Artikel	Hersteller
Reaktionspuffer	Promega
MgCl ₂	Promega
dNTPs	Promega
Primer	MWG Biotech
DNA Phage lambda	eurobio
100 bp ladder 3k (100 bp-3 kbp) (0,5µg/µl)	biomol (54670)
Taq DNA Polymerase (storage Buffer B, 5u/µl)	Promega (M 1665)
Agarose, ultrapure	NEEO

- andere Chemikalien:

- Magermilchpulver (z.B.: Skim Milk Powder, Fluka, BioChemika 70166)
- Natriumhypochloritlösung (ca. 13 % aktives Chlor), 1000 ml, Walter, Kiel

A.2 Puffer und Lösungen

- TAE-Puffer (50 fach konzentriert, Reinstwasser, autoklaviert):

40 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA (pH 8,0)

- TE-Puffer (einfach konzentriert, in Reinstwasser, autoklaviert)

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

- Bromphenolblau loading-dye (6 fach konzentriert)

50 % (v/v)	Glycerin
0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	in TAE-Puffer (einfach konzentriert)

- Orange G loading-dye (6 fach konzentriert, in Reinstwasser)

20 % (v/v)	Ficoll 400
50 mM	EDTA
0,001 % (w/v)	Farbstoff Orange G
	in Reinstwasser

- Dye-Stammlösung (6 fach konzentriert)

95 %	Orange G loading-dye
5 %	Bromphenolblau loading-dye

- lambda-DNA-Marker (10 ng lambda-DNA/ μ l)
 - 425 μ l TE Puffer (pH 8,0) (0,1 fach konzentriert)
 - 25 μ l lambda DNA Stammlösung (200 ng/ μ l)
 - 50 μ l Bromphenolblau loading-dye (6 fach konzentriert)
- 100 bp ladder 3 k
 - 40 μ l Reinstwasser
 - 10 μ l 100 bp ladder 3k (0,5 μ g DNA/ μ l)
 - 10 μ l Bromphenolblau loading-dye (6 fach konzentriert)

A.3 Nährmedien, Substrate, Dünger und Wachstumsregler

- SNA (verändert nach NIRENBERG 1976):
 - 1,0 g KH_2PO_4
 - 1,0 g KNO_3
 - 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 - 0,5 g KCl
 - 0,2 g Glucose (wasserfrei)
 - 0,2 g Saccharose
 - 15 g Agar
 - 1000 ml dest. Wasser
- PDA:
 - 39 g Fertigmedium (Difco, Fluka)
 - (4 g Kartoffel-Extrakt, 20 g Glucose, 15 g Agar)
 - 1000 ml dest. Wasser
- PDB (PD-Broth):
 - 24g Fertigmedium (Sigma)
 - (4 g Kartoffel-Extrakt, 20 g Glucose)
 - 1000 ml dest. Wasser
- WA6C (WA8C):
 - 6,0 (8,0) g Agar
 - 10 ml CaSO_4 -Stammlösung (10mM)
 - 990 ml dest. Wasser
- Reis (Langkorn) aus Biologischem Anbau, Fior di Riso, La Gallinella, Azienda Agricola di Velezzo Lonellina, Italia
- Einheitserde Typ ED 73, Einheitserdewerk Uetersen
- Flüssigdünger Wuxal Super, N-P-K: 8-8-6 mit Spurennährstoffen (Aglukon, Schering AG)
- Wachstumsregler Cycocel 720, 720 g Chlormequadchlorid/l, BASF

A.4 Verbrauchsmaterialien

- Petrischalen, 92 x 16 mm, Art. 82.1472, Sarstedt)
- Laborfilm (Parafilm, American National Can, USA)
- Extrelut NT 3 Fertigsäulen, Fertigsäulen zur Extraktion von lipophilen Stoffen auswässrigen Lösungen (1-3 ml Probe), Art. 1.15095.0001, Merck, Darmstadt; überwiegend Charge 19040
- HPLC-Zubehör
 - Rollrandflaschen klar, 0,8 ml, 30 x 8,2 mm (CSK Bernd Kolbe: VC080020)
 - Bördelkappen (Naturkautschuk/Butylgummi/Teflon; 1,0 mm, CSK Bernd Kolbe: CC0821110)
 - Bördelzange (Pierce 13312, Chemical Co.)
 - Lösungsmittel (2,5 l Glasflaschen):
 - Methanol, Rotisolv, HPLC Gradient Grade, Art. 7342.1, Carl Roth, Karlsruhe
 - Methanol, LiChrosolv, für die Flüssigkeitschromatographie, Art. 1.06007.2500, Merck, Darmstadt
 - Wasser, Rotisolv, HPLC, Art. A511.2, Carl Roth, Karlsruhe
 - Wasser, LiChrosolv, für die Chromatographie, Art. 1.15333.2500, Merck, Darmstadt
 - Ethylacetat, LiChrosolv, für die Flüssigkeitschromatographie, Art. 1.00868.2500, Merck, Darmstadt
- Reinstwasser (18,7 µS) (Millipore, siehe A.5)

A.5 Geräte

- eppendorf centrifuge 5804 R (Festwinkel)

Rotor F-45-30-11	(für 30 x 1,5ml / 2,0 ml, max. 14000 rpm $\hat{=}$ 20800 x g)
Rotor F-34-6-38	(für max. 6 x 85 ml, max. 11000 rpm $\hat{=}$ 15600 x g)
	(für max. 6 x 50 ml, max. 11000 rpm $\hat{=}$ 14600 x g)
	(für max. 6 x 30 ml, max. 11000 rpm $\hat{=}$ 14900 x g)
	(für max. 6 x 15 ml, max. 11000 rpm $\hat{=}$ 14500 x g)

Hier und auch in Kapitel 2 wurden die Vielfachen von g auf 100 gerundet.

Die verschiedene g-Zahl für die verschiedenen Röhrchen-Größen ergibt sich nach Formel A.1 durch den unterschiedlichen Radius (jeweils max. Radius).
- Heraeus Instruments Biofuge pico

(Tischzentrifuge) für 24 x 1,5 ml oder 2,0 ml (max. 13000 rpm $\hat{=}$ 16100 x g)
- RZB-Wert (relative Zentrifugal-Beschleunigung)
 - einheitsfrei, angegeben als Vielfaches der Erdbeschleunigung g:

$$RZB = 11,18 * (n/1000)^2 * r$$

Formel A.1

(n = Drehzahl in min⁻¹, r = Radius in cm)
- Reinstwasser-Anlage

Millipore-QUF plus Patrone: Millipore Purification Pak No. CPMQ004DE

- Autoklaven
 - Webeco, 120 Liter; Webecke & Co, Bad Schwartau
 - tuttnauer, Systec 2540 EL, 23 Liter; Systec GmbH, Wettenberg
- Ultra-Tiefkühlschrank
 - Heraeus Instruments, Herafreeze HFU586PlusV14
- HPLC-Geräte (ergänzende Angaben)
 - spectroMonitor 5000 (DAD)
 - Messzelle 15µl Volumen und 8 mm Lichtweg
 - 35 Watt Deuterium Lampe
 - Wellenlängen von 190 nm bis 360 nm (Schrittweite 1 nm)
 - maximale Datenaufnahme 10 Spektren pro Sekunde
 - Software Version 1.11
 - FL 3000 Spectra System (Variabler Fluoreszenz-Detektor)
 - Messzelle 2 mm x 1 mm, 3,1 µl illuminiertes Volumen
 - gepulste Xenon-Lampe; Frequenz von 20 Hz bei 600 V gewählt
 - mittlere Spaltbreite gewählt (20 nm)
 - Anregung 200 nm bis 650 nm
 - Emission 200 nm bis 650 nm
 - constaMetric 3500 Series (Programmierbare Pumpe)
 - Software Version 2.10 bzw. Version 1.22 (bei Nutzung mit LCtalk)
- Messgerät für die Quantenstromdichte: Model LI-250 Light Meter, Sensor Quantum-Q 27420; LI-COR Inc.
- Analysensieb für Getreide ISO 5223
(Langlochung: 1,8 mm, 2,0 mm, 2,2 mm, 2,5 mm, 2,8 mm x 20 mm; W. Wiemer GmbH D-59457 Werl; Made in Germany by Haver + Boecker D-59302 Oelde)
- Brutschrank Ehret Nr. 3155 (Ehret GmbH, Emmendingen-Kollmarsreute, Baden)
- Pflanzenwuchsschränke (Heraeus/Vötsch (Balingen))
 - HPS 400 (vier Regal-Roste: Fläche 4 x 0,28 m²)
 - HPS 2000 (ein Bodenrost: Fläche 1,60 m²)

Tabelle A.2: Beleuchtung in den Pflanzenwuchsschränken (Leuchtstoffröhren der Firma Osram).

a) Leuchtmittel

	HPS 400	HPS 2000
Lumilux plus (ECO) L 58W/21-840 (Kaltweiss)	3	14
Lumilux plus L 58W/31-830 (Warmweiss)	2	2
Fluora L 58W/77 (Pflanzenlicht)	1	4
Summe	6	20

b) mittlere Bestrahlungsstärke (in $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Gemessen wurde die PAR (photosynthese-tisch aktive Strahlung) im Bereich von 400 nm bis 700 nm an 12 (HPS 400) bzw. 25 (HPS 2000) Messpunkten im angegebenen Abstand von der Lichtquelle (Messgerät siehe Anhang A.5 Geräteliste).

	neue Leuchtmittel (mittel (min., max.))	Betriebsdauer	prozentuale Abnahme (Alterung der Leuchtmittel)
HPS 400, 15 cm	149 (124, 170)	ca. 1 $\frac{1}{4}$ Jahre	ca. 12 %
HPS 2000, 10 cm	460 (282, 674)	ca. 2 Jahre	ca. 27 %
HPS 2000, 25 cm	416 (241, 576)	ca. 2 Jahre	ca. 27 %
HPS 2000, 50 cm	337 (228, 438)	ca. 2 Jahre	ca. 27 %

A.6 Ergänzende Angaben zu *Fusarium*-Isolaten und Weizen-Sorten:

Tabelle A.3: Kodierung der *Fusarium*-Isolate 1 - 54. - entfällt. * orig. Name falls anders.

	Name	*	Person	Wirt	Ort	isoliert	Bemerkungen
1	A4/23	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
2	A4/24	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
3	A6/21	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
4	A6/23	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
5	A6/37	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
6	A6/40	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
7	A10/4	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
8	A12/11	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
9	A12/12	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
10	A12/13	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
11	A12/14	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
12	A12/15	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
13	A12/41	-	Goßmann	Weizen, Korn	Frontenhausen	99	-
14	C1/16	-	Goßmann	Weizen, Korn	Selm-Born	99	-
15	C1/36	-	Goßmann	Weizen, Korn	Selm-Born	99	-
16	C1/46	-	Goßmann	Weizen, Korn	Selm-Born	99	-
17	N1/22	-	Goßmann	Weizen, Korn	Schwartbuck	99	-
18	N1/40	-	Goßmann	Weizen, Korn	Schwartbuck	99	-
19	N1/44	-	Goßmann	Weizen, Korn	Schwartbuck	99	-
20	T1/6	-	Goßmann	Weizen, Korn	Dorn-burg/Steudnitz	99	-
21	T1/10	-	Goßmann	Weizen, Korn	Dorn-burg/Steudnitz	99	-
22	T1/12	-	Goßmann	Weizen, Korn	Dorn-burg/Steudnitz	99	-
23	T1/15	-	Goßmann	Weizen, Korn	Dorn-burg/Steudnitz	99	-
24	T1/18	-	Goßmann	Weizen, Korn	s.o.	99	-

Forts. Tabelle A.3:

	Name	*	Person	Wirt	Ort	isoliert	Bemerkungen
25	T1/19	-	Goßmann	Weizen, Korn	Dorn- burg/Steudnitz	99	-
26	T1/20	-	Goßmann	Weizen, Korn	s.o.	99	-
27	T1/22	-	Goßmann	Weizen, Korn	s.o.	99	-
28	T1/42	-	Goßmann	Weizen, Korn	s.o.	99	-
29	T1/43	-	Goßmann	Weizen, Korn	s.o.	99	-
30	L8hb	8h	Lepschy	Mais, Stengel	Niederbayern	96 od. 97	Einsporisolat
31	L10e	10	Lepschy	Mais, Stengel	Niederbayern	96 od. 97	Einsporisolat
32	4527 b	4527	Lepschy	Mais	unbekannt	85 od. 86	Einsporisolat
33	G2.2a	13/1	Goßmann	Miscanthus, Trieb- grund	Forchheim	3/94	Einsporisolat
34	L8hbWP	8h	Lepschy	Mais, Stengel	Niederbayern	96 od. 97	wie 30, aber mit Wirts- passage
35	L10eWP	10	Lepschy	Mais, Stengel	Niederbayern	96 od. 97	wie 31, aber mit Wirts- passage
36	4527bWP	4527	Lepschy	Mais	unbekannt	85 od. 86	wie 32, aber mit Wirts- passage
37	G2.2aWP 2	13/1	Goßmann	Miscanthus, Trieb- grund	Forchheim	3/94	wie 33, aber mit Wirts- passage
38	L12Qc	12Q	Lepschy	unbekannt	Niederbayern	85 od. 86	Einsporisolat
39	G2.1b	S 41	Goßmann, Sche- rer	Weizen/Blattscheide	Mering	92	Einsporisolat
40	4528	-	Lepschy	Mais	unbekannt	85 od. 86	-
41	Ta99/1	-	Ludewig	Weizen, Ähre	Tasdorf	7/98	-
42	W98/1e	-	Ludewig, Söch- ting	Weizen (Bandit), Ähre	Wolfenbüttel	7/98	Einsporisolat von glei- cher Ähre wie 43 ?
43	M98/1	-	Ludewig, Söch- ting	Weizen (Bandit), Ähre	Wolfenbüttel	7/98	-
44	1/99	-	Ludewig	Gerste, Halmbasis	unbekannt	1/99	-
45	2/99	-	Ludewig	Gerste, Halmbasis	unbekannt	1/99	-
46	3/99	-	Ludewig	Gerste, Halmbasis	unbekannt	1/99	-
47	Y1	-	Coja	unbekannt	Jugoslawien	unbe- kannt	1/00 auf Agar erhalten
48	Y2	-	Coja	unbekannt	Jugoslawien	s.o.	1/00 auf Agar erhalten
49	DSM4527	-	LBP/DSMZ	Mais	unbekannt	s.o.	-
50	DSM4528	-	LBP/DSMZ	Mais	unbekannt	s.o.	-
51	ZM4T	-	LBP	unbekannt	unbekannt	s.o.	-
52	38274I	-	LBP	unbekannt	unbekannt	s.o.	-
53	37972II	-	LBP	unbekannt	unbekannt	s.o.	-
54	83.89	-	LBP	unbekannt	unbekannt	s.o.	-

Tabelle A.4: Herkunft der *Fusarium*-Kontroll-Isolate der PCR.

Name	orig. Name	<i>Fusarium</i> -Art	Person	Wirt	Ort	isoliert
G2.1	S 41	<i>F. graminearum</i>	Goßmann/Scherer	Weizen, Blattscheide	Mering	92
L5/97	5/97	<i>F. culmorum</i>	Lepschy/Obst	Weizen, Korn	Bayern	97
G3.1	Isol. 10	<i>F. avenaceum</i>	Goßmann/Scherer	Weizen, Halmgrund	Blumberg	03/93
G4.1	2a/31	<i>F. poae</i>	Goßmann	Weizen, Korn	Güterfelde	06/93
G6.1	I W/No 22	<i>F. tricinctum</i>	Goßmann	Weizen, Halmgrund	Güterfelde	04/93
G7.1	Isol. 5	<i>F. sambucinum</i>	Goßmann/Scherer	Weizen/Halmgrund	Oberwiera	03/93
G8.1	IUD 1	<i>F. flocciferum</i>	Goßmann/Damm	Weizen	Blumberg	91
G9.1	IUD 11	<i>F. anthophilum</i>	Goßmann/Damm	Weizen	Blumberg	92

Tabelle A.5: Angaben zu den verwendeten Weizensorten (Beschreibende Sortenliste 1997/2001). - keine Angabe.

	SW / WW	Anfälligkeit nach BSL 1997/2001	Pflanzenlänge nach BSL	Herkunft	Züchter
Frontana	SW	-/-	-	Brasilien	*
Hanseat	WW	8/-	3	Deutschland	E. Eger
Piccolo	SW	-/5	2	Deutschland	Dr. J. Ackermann
Renan	WW	3/3	4	Deutschland	Agri Obtentions, Dr. P. Franck

* erhalten von Aroldo Linhares, EMBRAPA, Brasilien

A.7: Ergänzende Angaben zur taxonomischen Einordnung mittels PCR

Abbildung A.1: Agarose-Gel der PCR-Produkte der *Fusarium*-Isolate 34, 35, 36, 37, 44, 45 und 46 mit dem pathogenspezifischen Primerpaar für *F. graminearum* (Fg-11; 1,5 % Agarose, 20 µl PCR-Produkt). K = Kontroll-Isolat G2.1, M = Größen-Marker (416 ng DNA; 100-3000 bp).

Nur bei einer stärkeren Belichtung, in der die Banden der übrigen *Fusarium*-Isolate stark überstrahlt waren, konnte man die sehr schwache Bande bei *Fusarium*-Isolat 45 erkennen

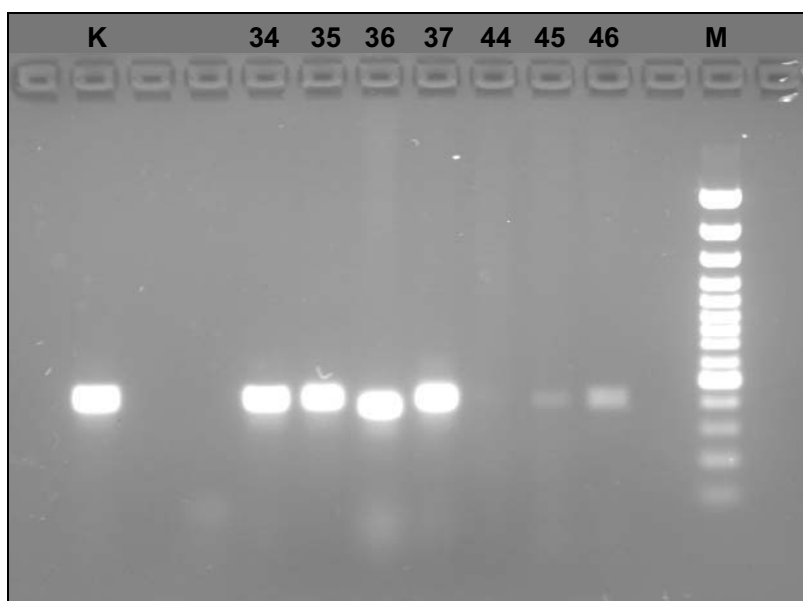


Tabelle A.6: Primer und PCR-Programme.

	interne Bezeichnung	Primer (5' -> 3'; f = forward, r = reverse)	Prod. gröÙe	Initial-Denat.	Den./Ann./Ext.	finale Exten.	Quelle
<i>F. culmorum</i>	Fc-35f	SCAR2-35f GAT GCC AGA CCA AGA CGA AG	472bp	95°C, 30"	95°C, 30"/65°, 30"/72°C, 45" (30 Zyk)	72°C, 10'	SCHILLING 1996
	Fc-35r	SCAR2-35r GAT GCC AGA CGC ACT AAG AT					
<i>F. graminearum</i>	Fg-11f	Fg11f CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA	300bp	95°C, 1'	95°C, 30"/62°C, 30"/72°C, 40" (40 Zyk)	72°C, 5'	NICHOLSON ET AL. (unpubl. observations, in DOOHAN <i>et al.</i> 1998)
	Fg-11r	Fg11r GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA					
<i>F. poae</i>	Fp-82f	Fp82f CAA GCA AAC AGG CTC TTC ACC	250bp	95°C, 1'	95°C, 30"/62°C, 30"/72°C, 40" (40 Zyk)	72°C, 5'	PARRY AND NICHOLSON 1996 (in DOOHAN <i>et al.</i> 1998)
	Fp-82r	Fp82r TGT TCC ACC TCA GTG ACA GGT T					
<i>F. avenaceum</i>	Fa-f	Af CAA GCA TTG TCG CCA CTC TC	920bp	95°C, 1'	95°C, 30"/60°C, 30"/72°C, 40" (40 Zyk)	72°C, 5'	Lees 1995 (in DOOHAN <i>et al.</i> 1998)
	Fa-r	Ar GTT TGG CTC TAC CGG GAC TG					

A.8 Ergänzende Angaben zur Untersuchung der Toxinproduktion *in vitro*

Tabelle A.7: Bearbeitungsdaten zu den HPLC-Proben (Reisversuche 1 und 2 (Verlauf der Toxinbildung und Screening-Versuch)).

Reisversuch 1 (Verlauf der Toxinbildung):							
Probetag	Proben- nahme (dpi)	Extraktion	Extrak- tionsvolu- mina (ml- ml- ml/10g)	HPLC	Bemerkungen		
3	08.09.00	08.09.00	30-15-15	20.02.01	6,67 ml Wasser pro 10 g TM Ab 21 Tagen wurden die Proben besser zerkleinert und die Proben zwischen den Extraktionen mit einem Spatel aufgelockert.		
6	11.09.	11.09.	30-15-15	21.02.	-		
10	15.09.	15.09.	30-15-15	22.02.	-		
14	19.09.	19.09.	30-15-15	27.02.	-		
21	26.09.	26.09.	30-15-15	06.03.	-		
27	02.10.	02.10.	30-15-15	26.04.	-		
35	10.10.	10.10.	30-15-15	07.05	-		
44	19.10.	19.10.	30-15-15	18.05.	-		
56	31.10.	31.10.	30-15-15	21.05.	-		
Reisversuch 2 (Screening nach 21 Tagen):							
Isolate	folgende WDHs bearbeitet	Proben- nahme	Gefrier- trocknung	Extraktion	Extr.-vol. (ml-ml- ml/10g)	HPLC	Bemerkungen
1-6	1,2	16.02.01	19.02.01	26.02.01	35-20-15	07.12.01	WDH am 05.02. 02 mit Fluoreszenz- Detektor wegen ZON
7-12	1,2	16.02.	19.02.	27.02.01	35-20-15	13.12.01	WDH am 06.02.02 mit Fluoreszenz-Detektor wegen ZON
13-18	1,2	16.02.	19.02.	28.02.01	35-20-15	30.01.02	ab hier alle Messtage mit Fluoreszenz- Detektor (wegen ZON)
19-24	1,2	16.02.	19.02.	01.03.01	35-20-15	31.01.02	-
25-29+38	1,2	16.02.	19.02.	02.03.01	35-20-15	08.02.02	-
39-44	1,2	16.02.	19.02.	05.03.01	35-20-15	12.02.02	-
30,32,34,36	1,2,3	16.02.	19.02.	06.03.01	35-20-15	13.02.02	-
31,33,35,37	1,2,3	16.02.	19.02.	07.03.01	35-20-15	14.02.02	-
45-49+51	1,2	16.02.	19.02.	08.03.01	35-20-15	19.02.02	-
50,52,53,54	1,2,3	16.02.	19.02.	15.03.01	35-20-15	20.02.02	-
1-11	3	16.02.	19.02.	08.08.01	35-20-15	22.02.02	-
12-24	3	16.02.	19.02.	09.08.01	35-20-15	25.02.02	-
23-29+38-40	3	16.02.	19.02.	13.08.01	35-20-15	27.02.02	-
41-49+51	3	16.02.	19.02.	14.08.01	35-20-15	28.02.02	-

Bei Reisversuch 1 wurden die Proben ohne Gefriertrocknung verarbeitet. Das Volumen des enthaltenen Wassers (6,67 ml) wurde als Extraktionsmittel mitgerechnet.

Im Reisversuch 2 wurden die Proben wegen der längeren Zeit bis zur Extraktion gefriergetrocknet und dann mit größerem Volumen extrahiert. Bis zur Extraktion lagerten die Proben im Exsikkator.

Die Isolate 14 und 40 zeigten nur spärliches Myzelwachstum. Einige der Proben waren bei der bearbeitung schwärzlich pigmentiert und zeigten ein überaus hohes Quellungsvermögen (Isolate 14, 17, 19).

A.9 Ergänzende Angaben zum Aggressivitätstest

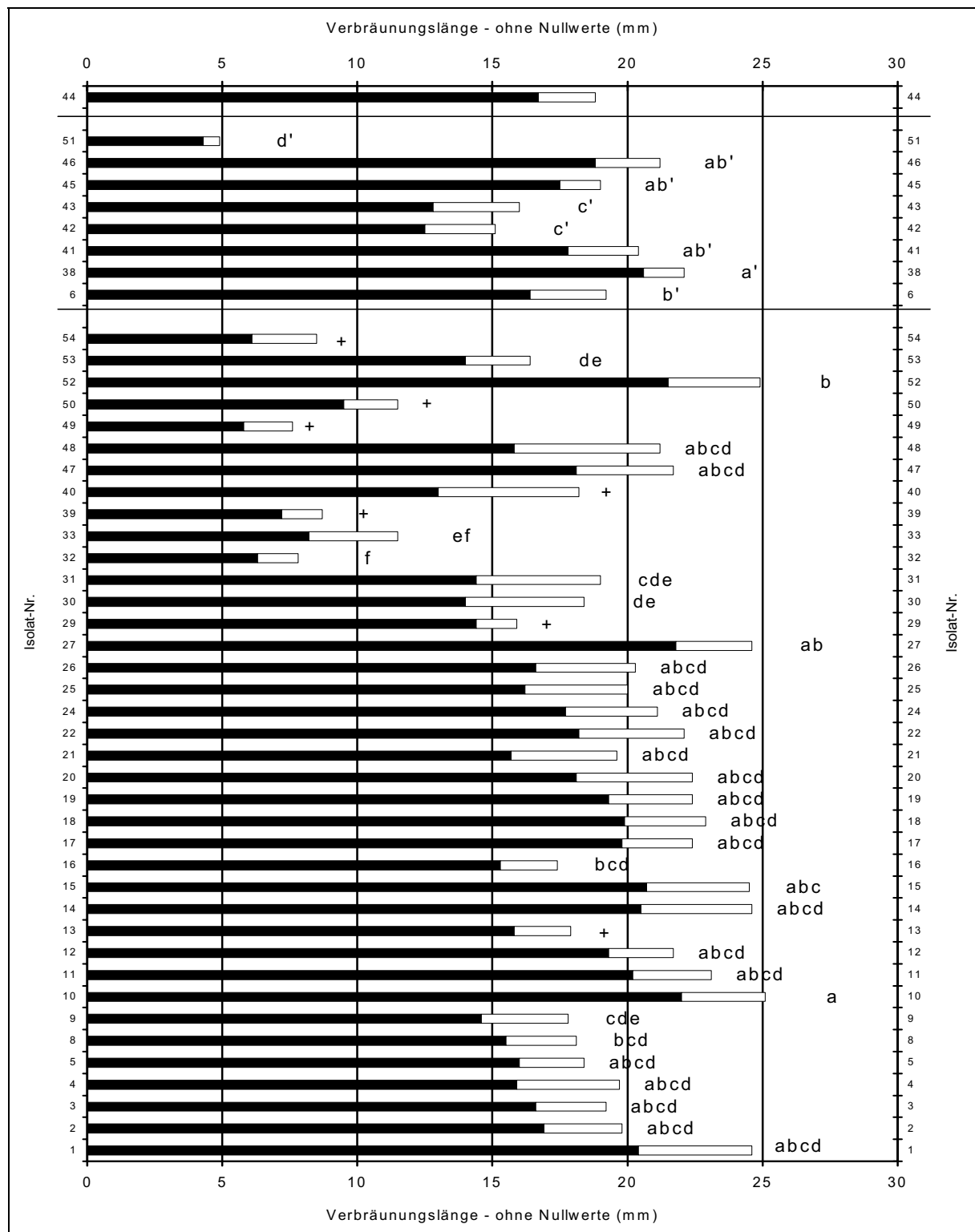


Abbildung A.2: Länge der Verbräunung an der Sproßbasis von Weizenkeimlingen (SW Picolo) nach künstlicher Inokulation mit verschiedenen *Fusarium*-Isolaten nach 7 Tagen in mm. Mittelwert aus acht WDH (schwarzer Balken) und Standardabweichung (weißer Balken). Pflanzen ohne Symptome (Nullwerte) gehen *nicht* in den Mittelwert mit ein. *F. graminearum* im unteren, Misch-Isolate im mittleren, *F. culmorum* im oberen Teil des Diagramms. Ergebnisse mit gleichem Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($\alpha=0,05$, $LSD=6,54$, $LSD'=3,60$). + = Isolate, die aufgrund zu geringer Sporendichte im Inokulum nicht statistisch mit verrechnet wurden.

Tabelle A.8: Übersichtstabelle über die Versuche 15 - 46 des Aggressivitätstests.

	WDH	Isolate	Inokulation	Alter SNA-Platten	Besonderheiten
15	1	17, 14, 1, 20	20.09.01	6W2T	-
16	2		02.10.01	8W	Perithezien und Ascosporen bei 1 und 17
17	1	43, 41, 47, 48	11.10.01	9W	-
18	2		16.10.01	9W5T	41 nur mit 424000 Sporen/ml
19	1	2, 3, 4, 5	25.10.01	6W1T	-
20	2		30.10.01	6W6T	teilweise nur sehr wenige Pflanzen
21	1	6, 7, 8, 9	08.11.01	6W	sehr wenige Pflanzen; 7 mit Kontaminante ($6,156 \times 10^6$ /ml kleine schwarze runde Sporen)
22	2		13.11.01	6W5T	7 mit Kontaminante ($3,677 \times 10^6$ /ml kleine schwarze runde Sporen)
23	1	15, 16, 18, 19	22.11.01	5W6T	neues Saatgut (trotzdem viele deformierte Pflanzen)
24	2		15.01.02	7W	andere Charge SNA-Platten verwendet (Jahreswechsel)
25	1	21, 22, 24, 25	24.01.02	6W2T	Tüten erst nach 7 Tagen entfernt
26	2		29.01.02	7W	-
27	1	29, 38, 39, 42	07.02.02	7W	Tüten erst nach 7 Tagen entfernt; 29 mit 72800 Sporen/ml; 39 mit 313600 Sporen/ml
28	2		12.02.02	7W5T	29 mit 159200 Sporen/ml; 39 mit 255200 Sporen/ml
29	1	30, 31, 32, 33	21.02.02	6W	-
30	2		26.02.02	6W5T	-
31	1	35, 36, 34, 37	07.03.02	5W6T	schlechte Keimungsrate (zu feucht)
32	2		12.03.02	6W4T	schlechte Keimungsrate (zu feucht); Kontrolle und 35 daher nur mit 3 Parallel-Ansätzen
33	1	44, 45, 46, 28	21.03.02	6W2T	28 nur mit 289600 Sporen/ml
34	2		26.03.02	7W	Tüten erst nach 7 Tagen entfernt; 28 mit 525600 Sporen/ml
35	1	51, 52, 53	04.04.02	6W	51 mit vielen kleinen runden Sporen (Konzentration ist die Summe aus den runden und sichelförmigen Sporen; nur 102000 (V36: 107200) sichelförmige Sporen/ml)
36	2		09.04.02	6W5T	
37	1	49, 50, 26, 27	18.04.02	6W	49 nur mit 36000Sporen/ml (V38: 64000); 50 nur mit 41250 Sporen/ml (V38: 24000) (mit erweiterter Zählung nach 2.3.2)
38	2		23.04.02	6W5T	
39	1	10, 11, 12, 13	02.05.02	6W1T	13 nur mit 216000 Sporen/ml
40	2		07.05.02	6W6T	13 nur mit 255750 Sporen/ml (mit erweiterter Zählung nach 2.3.2)
41	1	35, 36, 34, 37	16.05.02	7W2T	WDH von Versuch 31
42	2		21.05.02	8W	WDH von Versuch 32

Forts. Tabelle A.8:

Nr.	WDH	Isolate	Inokulation	Alter SNA-Platten	Besonderheiten
43	1	54, 40, 23, 28	30.05.02	6W2T	54 nur mit Myzel inokuliert (166500 (V44: 186000) lebende Myzelstücken/ml) (mit erweiterter Zählung nach 2.3.2); 40 mit nur 62000 (V44: 90000) Sporen/ml (mit erweiterter Zählung nach 2.3.2); bei 23 gibt es kleine, schmale längliche Sporen und etwas dickere ovalere Sporen (In konz. Susp. etwa 3/4 zu 1/4 (nur bei V43 erhoben) bzw. in verdünnter Suspension 20 zu 1): zusammen 500.000/ml; ausserdem sehr wenige typische <i>Fusarium</i> -Sporen (529/ml; V44 250/ml) (Myzel der schwarzen Kontaminante vorher entfernt; war auch effektiv); bei 28 zusätzlich zu den <i>Fusarium</i> -Sporen (500000/ml) noch viele kleine längliche Sporen (2,769 (V44: 2,255) Millionen/ml)
44	2		04.06.02	7W	
45	1	29	13.06.02	8W2T	Konzentrationsreihe (10000, 100000, 250000, 500000 Sporen/ml)
46	2		18.06.02	9W	

Anmerkung: Die Versuche 1-14 waren nicht ausgewertete Vorversuche.

Tabelle A.9: Stellschema der Töpfe der einzelnen Isolate im Pflanzenwuchsschrank HPS 400; Anzucht für Aggressivitätstest bis 7 dpi (Isolate A-D, Kontrolle K).

	links	Mitte links	Mitte	Mitte rechts	rechts	Etage
oben	B	C	D	K	A	4
Mitte oben	A	B	C	D	K	3
Mitte unten	K	A	B	C	D	2
unten	D	K	A	B	C	1

A.10 Ergänzende Angaben zu den Ähren-Inokulationen

Tabelle A.10: Programm der Pflanzenwuchsschränke HPS 2000 (20°C/13°C; 14h/10h).

Zeile	Zeit	Funktionen					Analog-Kanal	Sollwert (Analog)	Merkername	Zeitkonstante
		1	2	3	4	5				
0	0	*					1	65 %	[Feuchte:] 0	0
1	0	*					0	20 °C	[Bestrahlung1:] 0	0
2	0	*					0	20 °C	[Bestrahlung2:] 1	0
3	0	*					0	20 °C	[Bestrahlung3:] 1	0
4	Vorlauf (variabel)	*					0	20°C	[Temperatur: 1]	0
5	Schleife Nr. 1							Anfang	999mal	
6	0	*					1	65 %	[Feuchte:] 0	0
7	0	*					0	13 °C	[Bestrahlung1:] 0	0
8	0	*					0	13 °C	[Bestrahlung2:] 0	0
9	0	*					0	13 °C	[Bestrahlung3:] 0	0
10	600	*					0	13°C	[Temperatur: 1]	0
11	0	*					1	65 %	[Feuchte:] 0	0
12	0	*					0	20 °C	[Bestrahlung1:] 0	0
13	0	*					0	20 °C	[Bestrahlung2:] 1	0
14	0	*					0	20 °C	[Bestrahlung3:] 1	0
15	840	*					0	20°C	[Temperatur: 1]	0
16	Schleife Nr.1							Ende		

Zeit: Zeilen-Laufzeit

Funktionen: Hier können verschiedene Funktionen aktiviert werden (ja/nein):

1: Zeile aktiv, 2: Sollwert addieren, 3: Wait-Funktion, 4: e-Funktion, 5: s-Funktion
(3-5: legt die Ansteuerung der Sollwerte fest)

Analog-Kanal: Hier wird der Analog-Kanal gewählt, für den in der jeweiligen Zeile der Sollwert angegeben werden soll. Gewählt werden kann zwischen: 0 (Feuchte) und 1 (Temperatur).

Sollwert: Hier wird der Sollwert für den zuvor gewählten Analog-Kanal eingegeben. Die Einheit wird mit angezeigt.

Merkername: In dieser Spalte wird zum einen einer von mehreren Digital-Kanälen gewählt (nicht direkt im Listing angezeigt), und dieser dann entweder ein- (1) oder ausgeschaltet (0). Auch die Analog-Kanäle werden hier aktiviert bzw. nicht aktiviert. Zur Verfügung stehende Merkenamen sind:
Start, Sammelstörung, Temperatur, Feuchte, Bestrahlung 1 (schaltet 4 Glühlampen), Bestrahlung 2 (schaltet etwa 1/3 der Leuchtstoffröhren) Bestrahlung 3 (schaltet etwa 2/3 der Leuchtstoffröhren)

Zeitkonstante: Zeitkonstante τ für die unter "Funktionen" evtl. aktivierte e-Funktion

Tabelle A.11: Detaillierte Angaben und Beobachtungen zu den einzelnen Ähren-Inokulationen mit *Fusarium graminearum*; - entfällt.

Versuchs-Parameter	Vorversuch	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4 (F=Frontana)
Aussaat	8 Körner pro Topf, 13 cm-Töpfe, 56 Töpfe (7 x 8 gestellt)	5 Körner pro Topf, 13 cm-Töpfe, 77 Töpfe (7 x 11 gestellt) pro Wuchsschrank		4 Körner pro Topf, 9 cm-Töpfe, 144 Töpfe (9 x 16 gestellt) pro Wuchsschrank	3 (F 4) Körner pro Topf, 9 cm-Töpfe, 160 Töpfe (9 x 16 gestellt) pro Wuchsschrank
Nebentriebe entfernt	nein	nein		bis 5 Wochen nach Aussaat	bis 6 Wochen nach Aussaat
Wachstumsregler	4./6. Woche (variable Dosis als Vorversuch)	4, 6, 9 Wochen nach Aussaat		3, 5, 8 Wochen nach Aussaat	
Düngung	wöchentlich ab 5. Woche (variable Dosis als Vorversuch)	wöchentlich von 7. bis 17. Woche nach Aussaat		dreimal (7, 8, 11 Wochen nach Aussaat)	
Weitere Bemerkungen zur Anzucht	zusätzliche Beleuchtung durch Glühlampen; 2 Pflanzen pro Topf; gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen Dünger und Wachstumsregler getestet	zusätzliche Beleuchtung durch Glühlampen; leichter Lichtmangel bei Versuch 1 zu Beginn der Anzucht Temperaturerhöhung um 3°C (18. Woche) und nochmals um 2°C mit Verlängerung der Lichtphase um 2 Stunden (19. Woche)	zusätzliche Beleuchtung durch Glühlampen; leichter Lichtmangel bei Versuch 1 zu Beginn der Anzucht Temperaturerhöhung um 3°C (18. Woche) und nochmals um 2°C mit Verlängerung der Lichtphase um 2 Stunden (19. Woche)	stehendes Wasser in einem der Wuchsschränke unter dem Pflanzenbestand in der 20. Woche bemerkt (Isolate 34 und 37); hier auch mehr Schwärzepilze	phytopathogene Milbenart ab 21. Woche bemerkt (vermutlich <i>Bryobia spec.</i>)
Versuchsdauer	15 Wochen	20 Wochen, 5 Tage	17 Wochen, 2 Tage	21 Wochen, 6 Tage	23 Wochen
Ähren-Anzahl: Isolat (n)/Variante (n)	5 pro Sporendichte	34 (35), 37 (35), K (14)	35 (38), 36 (38), K (20)	Isolate jeweils 50, K (30)	Picolo 38, Frontana 44, Kontrolle jeweils über 10
Befeuchten der Ähren nach der Inokulation	nicht protokolliert	über gesamte Abreife	erste Tage nach Inokulation	erster und dritter Tag nach Inokulation	erster Tag nach Inokulation
Weitere Bemerkungen zur Inokulation	Misch-Inokulum (18 <i>Fusarium</i> -Isolate: 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 29); Ähren in allen Blühstadien verwendet Tüten von den Ähren schon nach 15 Stunden entfernt	-	-	Ähren in allen Blühstadien verwendet	Schüttler bei Inokulum-Produktion zeitweilig defekt und Temperatur mit über 25°C zu hoch
Spontan absterbende Ähren ab	nicht beobachtet	4 Wochen	19 Tage	16 Tage	14 Tage

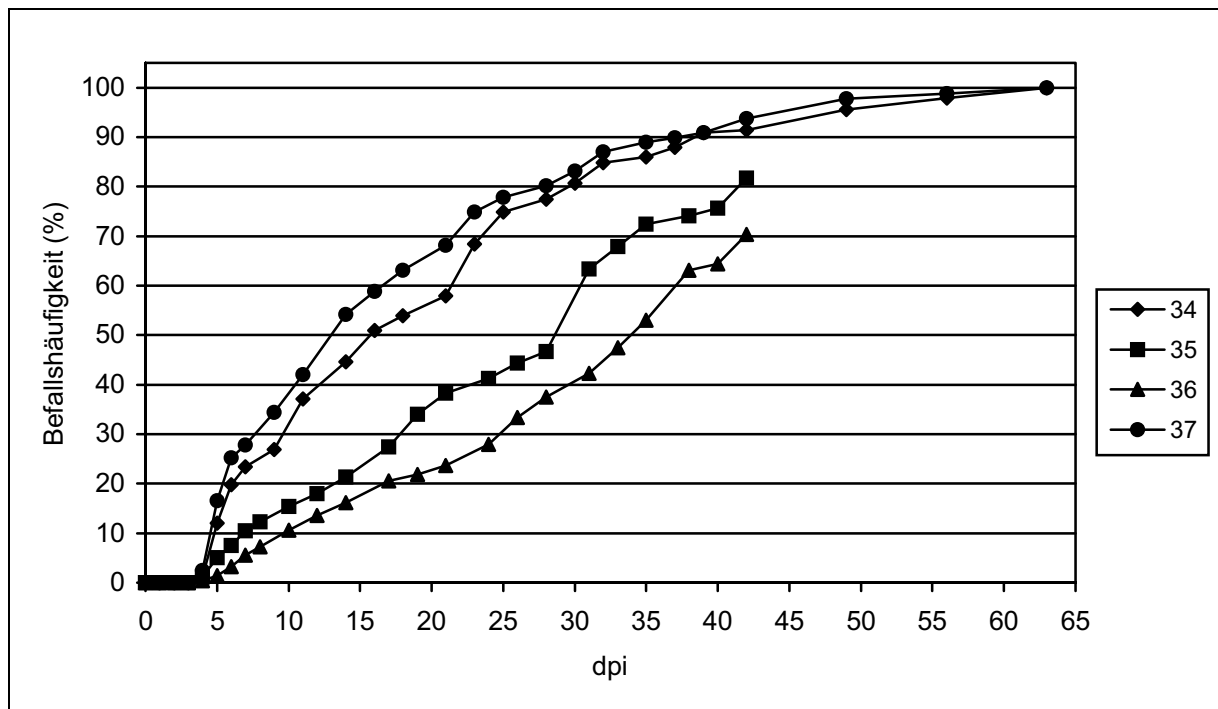


Abbildung A.3: Verlauf der mittleren Befallshäufigkeit der Ährchen (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 42 dpi (Isolate 35 und 36) bzw. 63 dpi (Isolate 34 und 37) in Prozent. Vergleich von vier *F. graminearum*-Isolaten aus Versuch 1 (Isolate 34 und 37) und Versuch 2 (Isolate 35 und 36). Die Zahl der untersuchten Einzelähren pro Isolat nahm von $n = 38$ (0 dpi, maximal) bedingt durch die Probennahme auf $n = 5$ ab (minimal, 42 dpi).

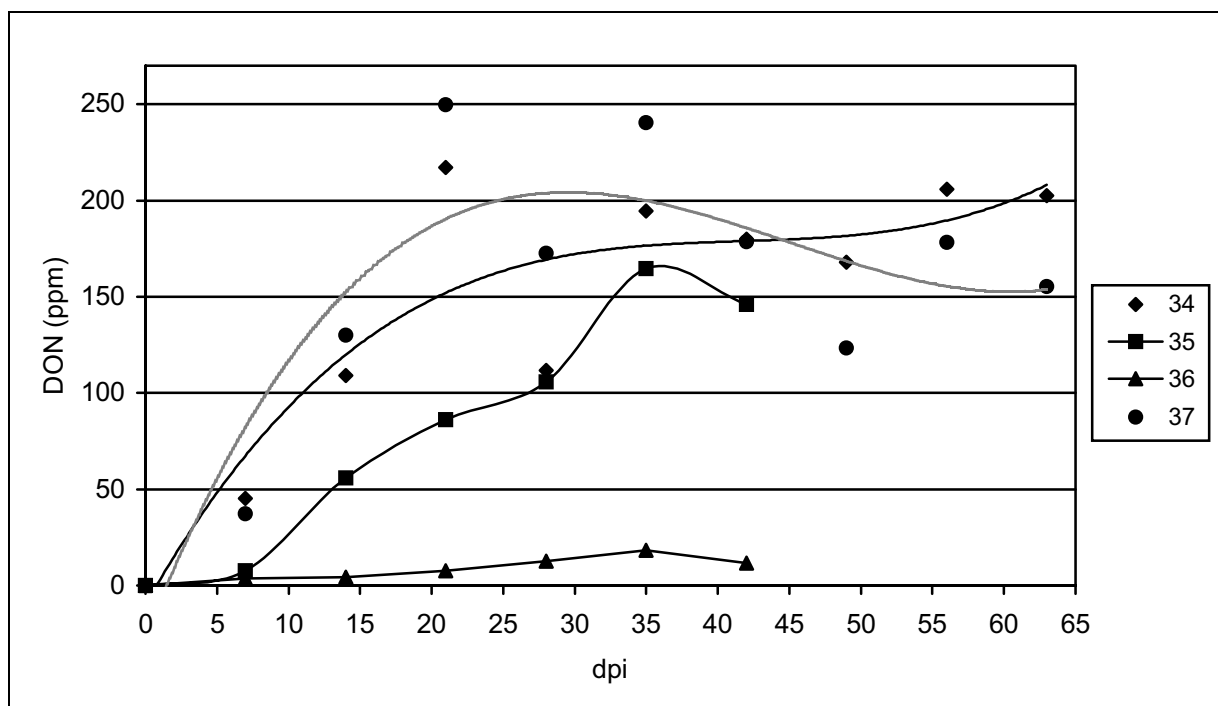


Abbildung A.4: Entwicklung des DON-Gehalts (DON 1) ganzer Ähren (Sommerweizen Picolo) nach einer künstlichen Ähren-Inokulation von 0 dpi bis 42 dpi (Isolate 35 und 36) bzw. 63 dpi (Isolate 34 und 37) in ppm (mg/kg TM). Vergleich von vier *F. graminearum*-Isolaten aus Versuch 1 (Isolate 34 und 37) und Versuch 2 (Isolate 35 und 36) ($n=3$). Regression: Polynom 3. Grades (Isolate 34 und 37). Helle Linie: Isolat 37.

Tabelle A.12: Pearson Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation. Gemeinsame Berechnung für die *F. graminearum*-Isolate 34 und 37 (7 dpi bis 63 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 54 Einzelähren in die Berechnung ein (n = 54). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge (µg/Ähre).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,86***	0,89***	-0,57***	-0,37**	-0,40**	0,46***	0,39**
2	DON 2		0,72***	-0,24	-0,44***	0,08	-0,02	-0,04
3	DON 3			-0,35**	0,04	-0,44**	0,51***	0,40**
4	Frischmasse (FM)				0,54	0,76***	-0,69***	-0,61***
5	Trockenmasse (TM)					-0,10	0,15	-0,001
6	Wassergehalt (WG)						-0,97***	-0,77***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,83***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Tabelle A.13: Pearson Korrelationskoeffizient (R) für die Zusammenhänge zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und fünf weiteren Parametern nach einer künstlichen Ähren-Inokulation. Gemeinsame Berechnung für die *F. graminearum*-Isolate 35 und 36 (7 dpi bis 42 dpi). Insgesamt gehen die Werte von 36 Einzelähren in die Berechnung ein (n = 36). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). DON 1 = DON-Gehalt (mg/kg TM), DON 2 = DON-Gehalt (mg/kg befallene TM), DON 3 = DON-Menge (µg/Ähre).

	1 DON 1	2 DON 2	3 DON 3	4 FM	5 TM	6 WG	7 BH	8 FUBK
1	DON 1	0,80***	0,97***	-0,56***	-0,25	-0,51**	0,55***	0,57***
2	DON 2		0,79***	-0,33*	-0,39*	-0,10	0,15	0,15
3	DON 3			-0,50**	-0,13	-0,51**	0,59***	0,58***
4	Frischmasse (FM)				0,49**	0,69***	-0,58***	-0,65***
5	Trockenmasse (TM)					-0,24	0,36*	0,23
6	Wassergehalt (WG)						-0,94***	-0,94***
7	Befallshäufigkeit der Ährchen (BH)							0,96***
8	Fläche unter der Befallskurve (FUBK)							

Tabelle A.14: Pearson Korrelationskoeffizient (R) für den Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt (3 Parameter) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und dem Befall (Parameter Befallshäufigkeit (BH) und Fläche unter der Befallskurve (FUBK)) auf Isolat-Ebene. Die Ergebnisse (Mittelwerte) der vier Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 4) werden für die Zeitpunkte 7 dpi bis 42 dpi getrennt miteinander korreliert. Jeder der Mittelwerte basiert auf 3 Einzelwerten. Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). Fettgedruckte Werte: engste Korrelation in jeder Zeile. Daten aus den Ähren-Inokulationen 1 und 2.

dpi	7	14	21	28	35	42
BH/DON1	0,953*	0,962*	0,996**	0,861	0,980*	0,985*
BH/DON2	0,836	0,530	0,960*	0,652	0,946	0,971*
BH/DON3	0,996**	0,967*	0,964*	0,845	0,975*	0,988*
FUBK/DON1	0,926	0,973*	0,987*	0,950*	0,945	0,852
FUBK/DON2	0,799	0,594	0,924	0,831	0,883	0,808
FUBK/DON3	0,982*	0,992**	0,939	0,918	0,950*	0,862

Tabelle A.15: Pearson Korrelationskoeffizient (R) für den Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt (DON 2 und DON 3) von Weizenähren (Sommerweizen Picolo) und der Befallshäufigkeit, der Befallsstärke und der Fläche unter der Befallskurve der Ährchen auf Isolat-Ebene. Die Ergebnisse (Mittelwerte) der vier Isolate 34, 35, 36 und 37 (n = 4) werden für die Zeitpunkte 6 dpi bis 56 dpi getrennt miteinander korreliert. Jeder der Mittelwerte basiert auf 3 Einzelwerten (Isolat 35, 43 dpi: 2 Einzelwerte). Signifikante Beziehungen sind gekennzeichnet mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) oder *** (p < 0,001). - = Wert nicht vorhanden. Fettgedruckte Werte: engste Korrelation in jeder Zeile. Daten aus der Ähren-Inokulation 3.

	DON 2								
	6	10	14	21	28	35	43	49	56
BH	0,918	0,54	0,842	0,798	0,883	0,986*	0,824	0,838	0,704
BS	-	0,736	0,819	0,814	0,887	0,974*	-	-	-
FUBK	0,9661*	0,642	0,9664*	0,65	0,85	0,867	0,883	0,955*	0,89

	DON 3								
	6	10	14	21	28	35	43	49	56
BH	0,979*	0,674	0,925	0,992**	0,953*	0,854	0,972*	0,906	0,553
BS	-	0,868	0,943	0,983*	0,915	0,921	-	-	-
FUBK	0,983*	0,754	0,983*	0,962*	0,818	0,99**	0,914	0,878	0,783

Tabelle A.16: Bearbeitungsdaten zu den HPLC-Proben (Ährenversuche 1-4). - = nicht vorhanden.

Probetag (dpi)	Proben-nahme	Gefrier-trocknung	Mahlen und Einwiegen	Einwaage (g)	Extraktion	Extrak-tionsvolu-mina (ml-ml/ml/g)	HPLC	Bemer-kungen
Ährenversuch 1								
0	03.07.00	04.07.00	06.07.00	variabel (0,3-0,6)	06.07.00	12-9-6	11.07.00	-
7	10.07.	11.07.	13.07.	0,54	13.07.	8-6-4	26.09.	-
14	17.07.	18.07.	20.07.	1,0	20.07.	8-6-4	27.09.	-
21	24.07.	25.07.	27.07.	0,7	27.07.	8-6-4	28.09.	-
28	31.07.	01.08.	03.08.	1,0	03.08.	8-6-4	29.09.	-
35	07.08.	08.08.	10.08.	0,8	10.08.	8-6-4	19.10.	-
42	14.08.	15.08.	17.08.	0,7	17.08.	8-6-4	02.10.	-
49	21.08.	22.08.	24.08.	1,0	24.08.	8-6-4	31.10.	-
56	28.08.	29.08.	31.08.	0,6	31.08.	8-6-4	20.10.	-
63	04.09.	05.09.	07.09.	0,8	07.09.	8-6-4	03.10.	-
Ährenversuch 2:								
0	03.11.	07.11.	09.11.	0,3	09.11.	12-9-6	07.02.01	-
7	10.11.	14.11.	16.11.	0,5	16.11.	12-9-6	07.02.01	-
14	17.11.	21.11.	23.11.	0,75	23.11.	8-6-4	08.02.01	-
21	24.11.	28.11.	30.11.	1,0	30.11.	8-6-4	12.02.01	-
28	01.12.	05.12.	07.12.	1,0	07.12.	8-6-4	13.02.01	-
35	08.12.	12.12.	14.12.	0,75	14.12.	8-6-4	14.02.01	-
42	15.12.	19.12.	21.12.	0,75	21.12.	8-6-4	15.02.01	-
Ährenversuch 3:								
3	23.03.01	09.04.	11.04.	0,05-0,2	25.09.01	32-24-16	17.04.02	nur noch Restmateri-al
6	26.03.01	27.03.	29.03.	0,5	11.04.01	12-9-6	15.04.02	-
10	30.03.	02.04.	04.04.	0,6	07.05.01	12-9-6	11.04.02	-
14	03.04.	04.04.	unbekannt	0,7	10.09.01	12-9-6	16.04.02	-
21	10.04.	11.04.	17.04.	0,7	11.09.01	12-9-6	24.04.02	-
28	17.04.	18.04.	20.04.	0,7	12.09.01	12-9-6	25.04.02	-
35	24.04.	25.04.	27.04.	0,6	13.09.01	12-9-6	26.04.02	-
43	02.05.	07.05.	14.05.	0,8	14.09.01	12-9-6	29.04.02	-
49	08.05.	09.05.	15.05.	0,5	17.09.01	12-9-6	30.04.02	-
56	15.05.	16.05	21.05	0,4	18.09.01	12-9-6	02.05.02	-
63* ²	22.05.	unbekannt	-	-	-	-	-	-
	Spindel	26.06.	28.06.	0,2	19.09.01	12-9-6	06.05.02	-
	Spelzen	26.06.	28.06.	0,8	20.09.01	12-9-6	09.05.02	-
	Körner	29.08.	10.09.	0,8	21.09.01	12-9-6	21.05.02	-
Ährenversuch 4:								
7	13.09.01	17.09.	19.09.	0,8	14.05.02	12-9-6	22.05.02	-
21	27.09.01	02.10.	04.10.	0,8	16.05.02	12-9-6	24.05.02	-
63* ¹	08.11.01	12.11.	27.11.	0,8	15.05.02	12-9-6	27.05.02	-

Die Proben wurden noch am Tag der Probennahme eingefroren (-20°C), zum angegebenen Termin gefriergetrocknet (48 Stunden), dann entweder direkt gemahlen und eingewogen, oder aber im Exsikkator bei Raumtemperatur zwischengelagert.

Nach der Einwaage erfolgte entweder die Extraktion noch am selben Tag oder eine erneute Zwischenlagerung (immer bei -20°C gefroren) bis zur Extraktion. Die Extrakte werden gefroren bis zur Messung gelagert (bei -20°C oder -70°C, verschlossen mit Laborfilm oder nicht).

*¹ Die Proben von Ährenversuch 4 / 63dpi wurden ausnahmsweise nach der ersten regulären Gefriertrocknung für 12 Tage eingefroren, dann erneut für 24 Stunden gefriergetrocknet, und erst dann (am 27.11.01) gemahlen und eingewogen.

*² Eine Ausnahme bildeten hier die Proben von Ährenversuch 3 / 63dpi. Nach der Gefriertrocknung wurden die Proben in Spindel, Spelzen und Körner gesplittet und im Exsikkator gelagert. Die Spindeln und Spelzen wurden erneut 48 Stunden gefriergetrocknet und normal weiter verarbeitet. Die Körner wurden am 12.06.01 in 3 Befallsklassen geteilt, ab dem 20.06. auf Korngrößenverteilung untersucht, und dann weiter im Exsikkator gelagert (Raumtemperatur). Eine erneute Gefriertrocknung (48 Stunden) und reguläre Weiterverarbeitung erfolgte ab dem 21.09.01.

A.11 Ergänzende Angaben zur Analytik der Mykotoxine (HPLC)

Ältere HPLC-Gradienten (M1b und M1a):

Bei beiden Gradienten wurde die Merck-Säule verwendet:

Tabelle A.17: Gradientenverlauf der Methode M1b (Ähren-Matrix).

Zeit (min)	0	5	8	13	23	23,1 bis 35
% Wasser	87,5	82,5	82,5	70	70	87,5
% Methanol	12,5	17,5	17,5	30	30	12,5
Flussrate (ml/min)	1,5					
Vorgang	Trennung					Äquilibrieren

Tabelle A.18: Gradientenverlauf der Methode M1a (Ähren-Matrix).

Zeit (min)	0	4	6	8	12	13	15	23	25	26	31	31,1 bis 42
% Wasser	95	92	92	90	81	81	72,5	60	60	0	0	95
% Methanol	5	8	8	10	9	9	27,5	40	40	100	100	5
Flussrate (ml/min)	1,5											
Vorgang	Trennung									Spülen		Äquilibrieren

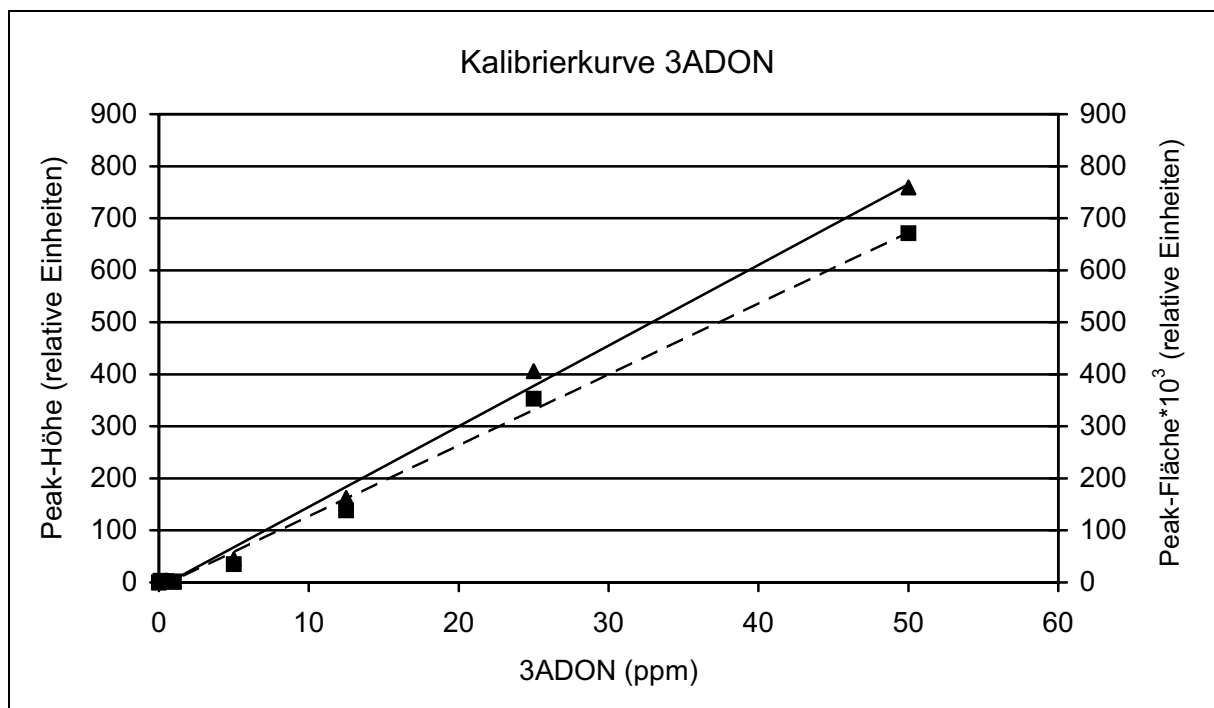


Abbildung A.5: Kalibrierkurve für 3ADON (Standard am 02.10.01 pipettiert, am 29.11.01 gemessen; Methode M2; 220 nm). Relative Einheiten von LC-Talk-Software. ▲ = flächenbezogene Daten (—); ■ = höhenbezogene Daten (- - -)

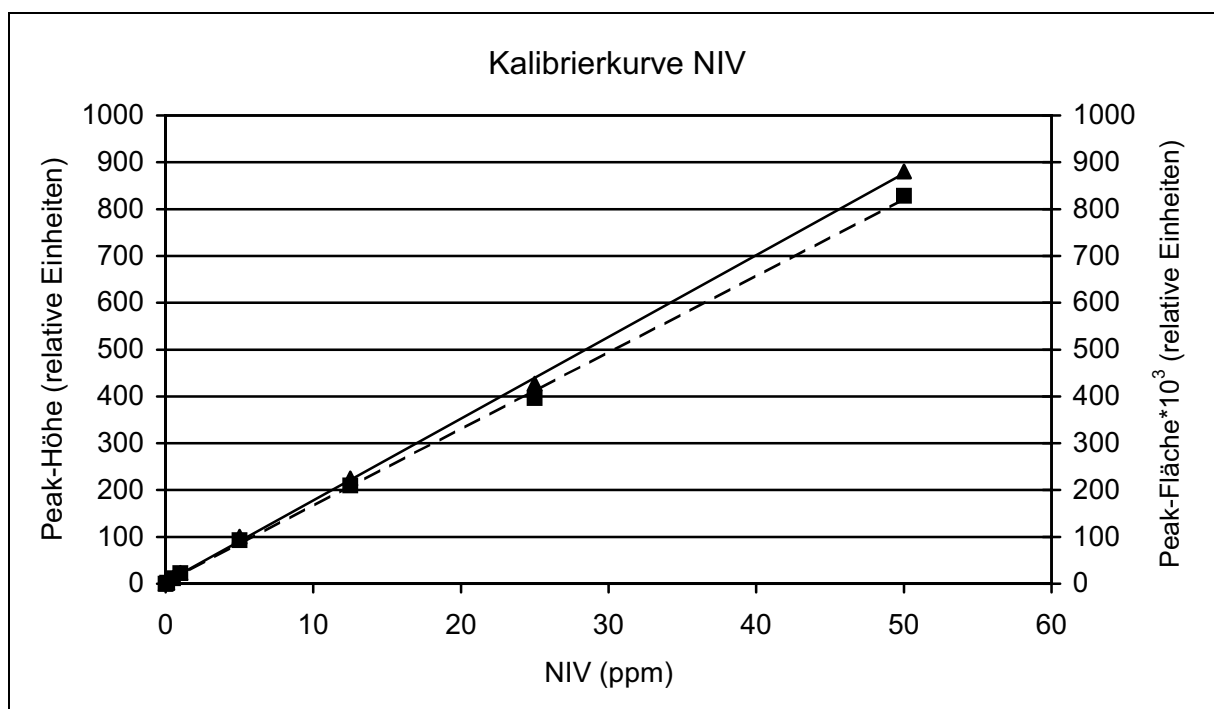


Abbildung A.6: Kalibrierkurve für NIV (Standard am 02.10.01 pipettiert, am 29.11.01 gemessen; Methode M2; 220 nm). Relative Einheiten von LC-Talk-Software. ▲ = flächenbezogene Daten (—); ■ = höhenbezogene Daten (- - -)

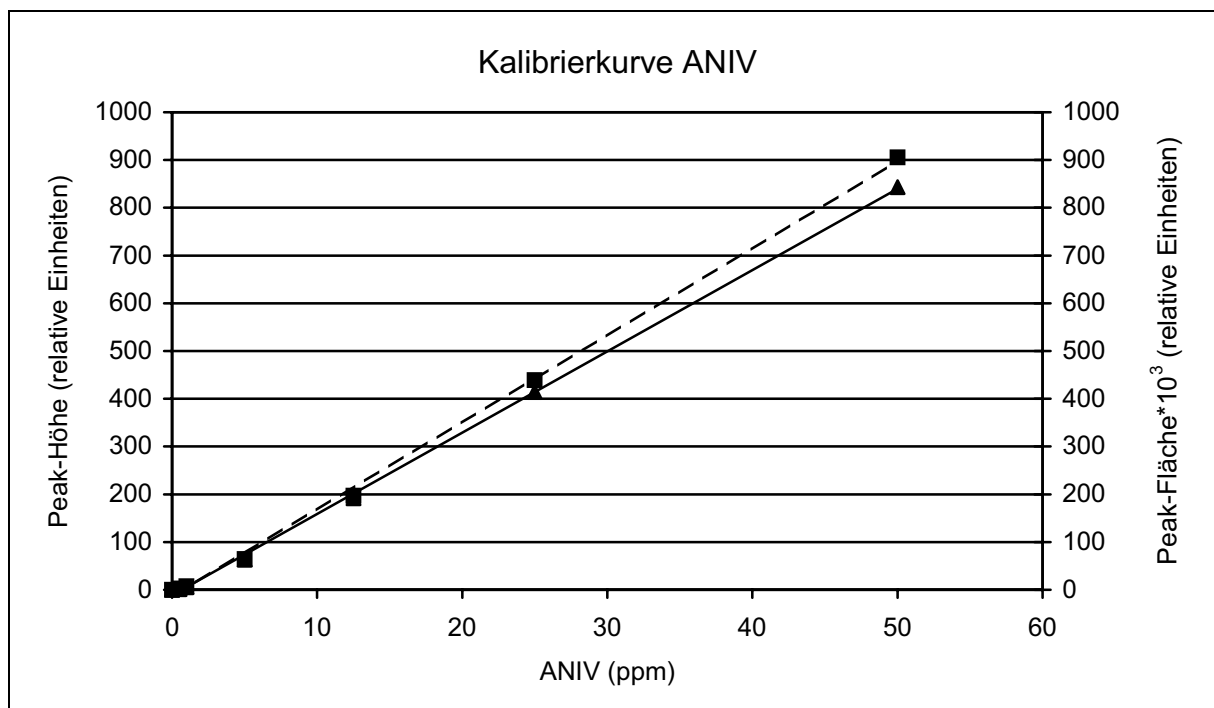


Abbildung A.7: Kalibrierkurve für ANIV (Standard am 02.10.01 pipettiert, am 29.11.01 gemessen; Methode M2; 220 nm). Relative Einheiten von LC-Talk-Software. ▲ = flächenbezogene Daten (—); ■ = höhenbezogene Daten (- - -)

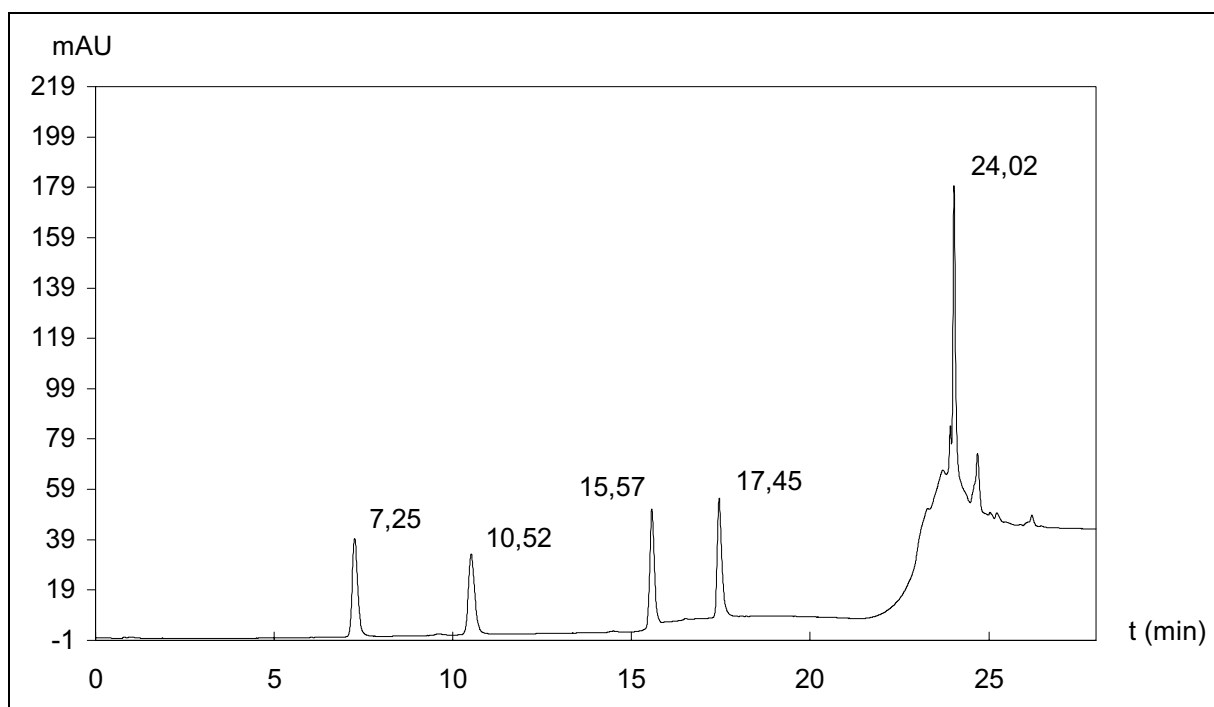


Abbildung A.8: HPLC-Chromatogramm eines 25 ppm-Mischstandards (Trichothecene und Zearalenon bei 220 nm, Methode M2). NIV bei 7,25, DON bei 10,52, ANIV bei 15,57, ADON bei 17,45, ZON bei 24,02.

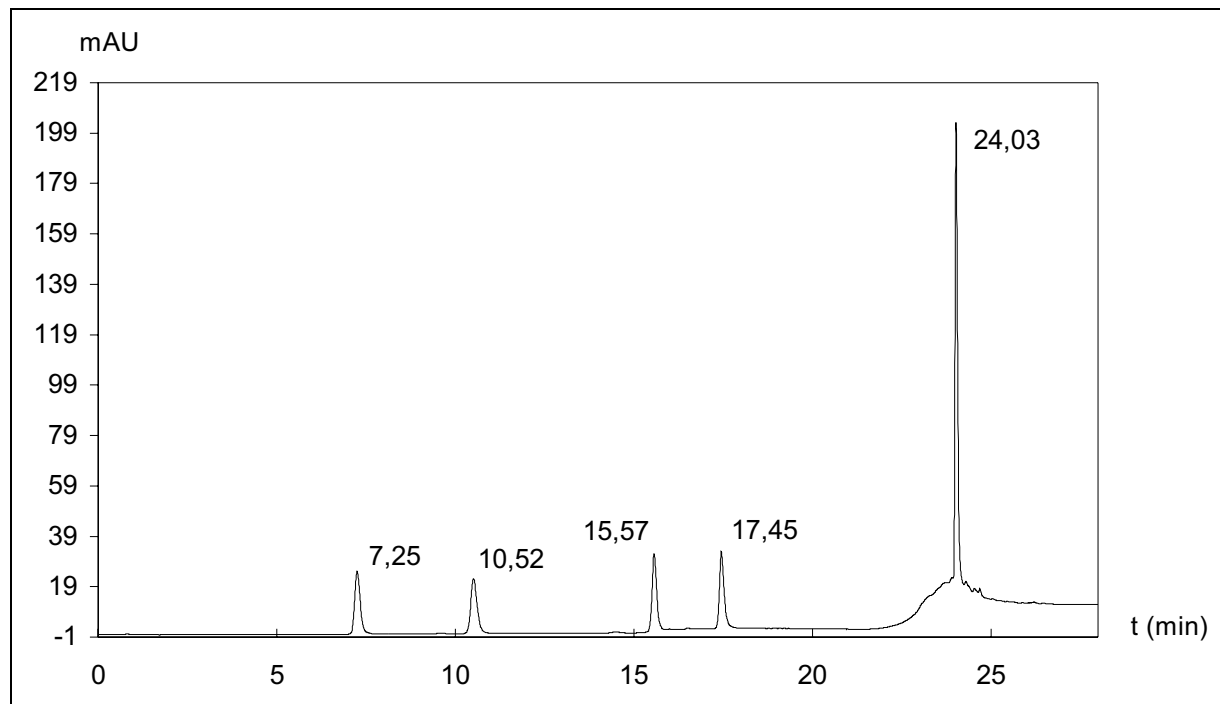


Abbildung A.9: HPLC-Chromatogramm eines 25 ppm-Mischstandards (Zearalenon und Trichothecene bei 236 nm, Methode M2). ZON bei 24,03, NIV bei 7,25, DON bei 10,52, ANIV bei 15,57, ADON bei 17,45.

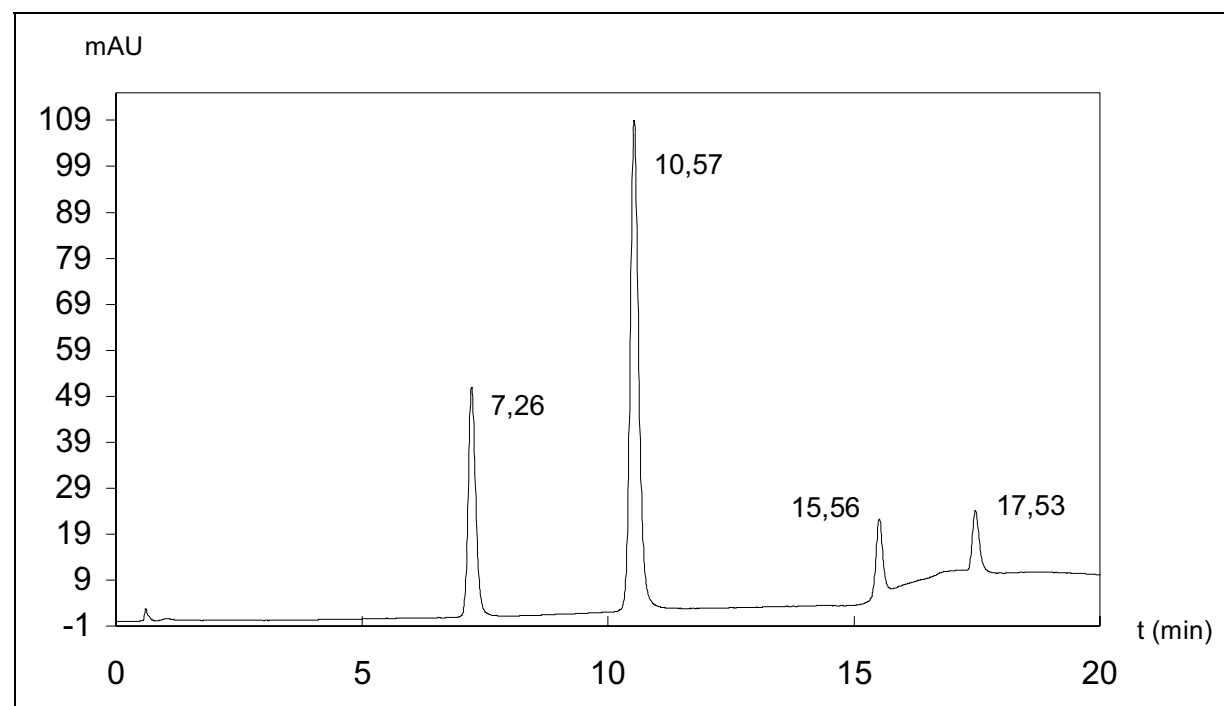


Abbildung A.10: HPLC-Chromatogramm eines degenerierten 25 ppm-Mischstandards (Alter ca. 13 Monate; Trichothecene bei 220 nm, Methode M2). NIV bei 7,26, DON bei 10,57, ANIV bei 15,56, ADON bei 17,51.

Auffällig sind die viel zu hohe DON-Konzentration und die deutlich zu niedrigen Konzentrationen von ANIV und ADON (siehe 2.9.5).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Verreet danke ich für die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft und das große Engagement bei der Finanzierung dieses Vorhabens.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Dehne für die Übernahme des Koreferats.

Vor allem möchte ich mich bei Herrn Dr. habil. Kabsch für die ebenso unermüdliche wie umfassende Unterstützung im Doktoranden-Alltag bedanken. Stets war er ansprechbar und eine unerschöpfliche Hilfe, wenn kleine oder große Schwierigkeiten welcher Art auch immer auftraten oder es um fachlichen Rat und Diskussion ging. Solche Unterstützung, persönliche Ermutigung und Motivation ist jedem Doktoranden zu wünschen.

Mein Dank gilt Herrn Dr. habil. Aumann, der sich gemeinsam mit Herrn Dr. habil. Kabsch der kritischen Durchsicht der Arbeit angenommen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei all denen bedanken, die im Institut für Phytopathologie, der AG QUASI (z.B. Frau Prof. Dr. Schwarz, Herr Dr. Drusch) oder anderen Instituten, Einrichtungen bzw. Firmen tätig sind oder waren und die ich hier unmöglich alle aufzählen kann. Sei es, dass sie direkt an dieser Arbeit beteiligt waren oder Geräte, Material oder Know-How bereitgestellt haben (z. B. Herr Dr. Gerendas: FL-Detektor, Frau Dr. Goßmann: *Fusarium*-Isolate, Herr Dr. Schnieder: PCR-Technik, Herr Alt: LCtalk) oder dass sie einfach Super-Kollegen waren. Ich freue mich, dass viele gute Beziehungen entstehen konnten. Stellvertretend für alle Kollegen möchte ich hier Frau Helga Ladehoff nennen, die in unglaublicher Ausdauer und Bravour die enervierende Routine des Aggressivitätstests auf sich genommen hat.

Gedankt sei auch allen Korrekturlesern, die sich durch diese Seiten gekämpft haben.

Auch in meinem privaten Umfeld haben mich viele Freunde und Bekannte in Höhen und Tiefen der Promotionszeit begleitet und so manche zeitliche Einschränkung meinerseits ertragen. Vielen Dank dafür und für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, sei es durch Wort, Tat oder Gebet.

Nun möchte ich meiner Familie danken. Insbesondere meinen Eltern, denen ich nicht nur mein Interesse an der Natur verdanke, sondern die mir durch Unterstützung in allen Bereichen meine akademische Ausbildung ermöglicht haben. Ebenso allen anderen, die stets mit großem Interesse das Vorhaben verfolgt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Wiebke.

Lebenslauf

Name	Andreas Ludewig, geb. Meyer
Geburtsdatum	05.05.1972
Geburtsort	Neumünster
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet seit 1999
1978 - 1982	Grundschule in Neumünster
1982 - 1991	Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Neumünster Abschluss: Abitur
1991 - 1997	Studium der Biologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU) (Botanik, Mikrobiologie, Biochemie, Phytopathologie) Abschluss: Diplom-Biologe
1995	wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Phytopathologie der CAU
1997 - 1998	Freier Mitarbeiter am Institut für Phytopathologie der CAU
seit 1998	Promotion im Fachbereich Agrarwissenschaften der CAU, Institut für Phytopathologie